



①9



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

①1 Número de publicación: **2 355 731**

⑤1 Int. Cl.:
C12Q 1/68 (2006.01)

⑫

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

⑨6 Número de solicitud europea: **05256463 .0**

⑨6 Fecha de presentación : **18.10.2005**

⑨7 Número de publicación de la solicitud: **1652937**

⑨7 Fecha de publicación de la solicitud: **03.05.2006**

⑤4 Título: **Prueba de diagnóstico para anomalía del ojo del Collie.**

③0 Prioridad: **20.10.2004 US 620547 P**

④5 Fecha de publicación de la mención BOPI:
30.03.2011

④5 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
30.03.2011

⑦3 Titular/es:
CORNELL RESEARCH FOUNDATION, Inc.
20 Thornwood Drive, Suite 105
Ithaca, New York 14850, US

⑦2 Inventor/es: **Acland, Gregory M.;**
Kukekova, Anna V.;
Aguirre, Gustavo D.;
Ostrander, Elaine;
Akey, Dayna y
Goldstein, Orly

⑦4 Agente: **Justo Bailey, Mario de**

ES 2 355 731 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCION

CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención se refiere en general a un trastorno ocular hereditario, la anomalía del ojo del Collie (CEA), que afecta al desarrollo de la coroides y la esclerótica en caninos. Más particularmente, la invención se refiere a un método para identificar perros como genéticamente normales, heterocigotos para u homocigotos para el alelo de la enfermedad CEA.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

La anomalía del ojo del Collie (CEA) es un trastorno ocular hereditario canino que afecta al desarrollo de la coroides y la esclerótica. La enfermedad se segrega en varias razas de perros incluyendo Rough y Smooth Collie, Border Collie, pastores australianos, Lancashire Heeler, y perro pastor de Shetland. El fenotipo clínico varía significativamente entre perros afectados de todas las razas. El fenotipo de CEA primario, hipoplasia corioidea (HC), se caracteriza por hipoplasia regional (subdesarrollo) de la coroides, que es el lecho altamente vascularizado del ojo que se encuentra debajo de la retina. Habitualmente, esta lesión da como resultado un defecto de ventana oftalmoscópicamente detectable en el fondo ocular ubicado en la zona temporal con respecto al nervio óptico.

En la mayoría de perros levemente afectados, la HC es la única lesión evidente, y muchos de estos perros no presentarán consecuencias clínicas obvias y conservarán una visión aparentemente normal durante toda su vida. En perros gravemente afectados, también pueden darse lesiones colobomatosas de la cabeza del nervio óptico y/o tejidos adyacentes. Los colobomas son evaginaciones de la pared del ojo, en la que se ubica la esclerótica delgada. En los casos más graves, pueden desarrollarse desprendimientos de retina completos o localizados, y/o neovascularización y hemorragia intraocular, de los que todos pueden conducir a ceguera. Estas manifestaciones graves de la CEA se observan sólo en perros afectados también con la lesión hipoplásica corioidea primaria.

Se ha establecido previamente (Lowe JK, *et al.* Genomics julio de 2003; 82(1):86-95) que el fenotipo de CEA primario se hereda por medio de un gen que mapea en una región de 3,9 cM del cromosoma canino 37, y se segrega como un rasgo autosómico recesivo con casi el 100% de penetración. Sin embargo, debido a que no ha habido identificación de una alteración del gen asociado con CEA, no ha sido posible la detección de la enfermedad. Por tanto, sigue habiendo una necesidad en la industria de la cría canina de una prueba genética que permita la identificación directa de perros que son normales, portadores o afectados con CEA.

SUMARIO DE LA INVENCION

La presente invención proporciona un método para identificar perros que son genéticamente normales, heterocigotos para u homocigotos para el alelo de la enfermedad CEA. El método comprende las etapas de obtener una muestra biológica que comprende ADN genómico del perro y someter a prueba la muestra biológica para detectar la presencia o ausencia de una delección de los nucleótidos correspondientes a los nucleótidos desde la posición 9.302 hasta la posición 17.101 de la SEQ ID NO:1 dentro del cromosoma 37. La presencia de la delección en ambos alelos es indicativa de un perro que es homocigoto para el alelo de la enfermedad CEA. La presencia de la delección en sólo un alelo es indicativa de un perro que es heterocigoto para el alelo de la enfermedad CEA, y la ausencia de la delección en ambos alelos es indicativa de un perro que es normal para CEA. Puede someterse a prueba la presencia o ausencia de la delección mediante amplificación del ADN seguido por el análisis de los productos de amplificación.

La presente invención también proporciona kits para el diagnóstico de un perro como normal, heterocigoto para, u homocigoto para el alelo de la enfermedad CEA. Tales herramientas y/o kits ayudan a los criadores a identificar perros normales, portadores y perros mutantes homocigotos. Los perros que se determina que son heterocigotos para u homocigotos para el alelo de la enfermedad pueden eliminarse del pie de cría o reproducirse con perros genéticamente normales.

BREVE DESCRIPCION DE LOS DIBUJOS

La figura 1 proporciona la secuencia de SEQ ID NO:1 que corresponde a una región del cromosoma 37 en perros. La SEQ ID NO:1 es un cóntigo (una secuencia consenso derivada de múltiples secuencias solapantes) de perros no afectados. La zona delecionada en perros afectados y en un cromosoma en perros que son heterocigotos para el alelo de CEA corresponde a los nucleótidos de 9.302 a 17.101 de la SEQ ID NO:1, que se indican en minúsculas. La SEQ ID NO:1 corresponde a los nucleótidos de 28.676.370 a 28.694.530, (inclusive, tamaño 18.161 pb) de la secuencia del genoma canino montada de dominio público, montaje julio de 2004, al que puede accederse a través de GenBank o en el sitio de bioinformática del genoma de la UCSC en <http://genome.ucsc.edu/>. La SEQ ID NO:1 corresponde a los nucleótidos 72.769-90.929 del intervalo de desequilibrio de ligamiento de anomalía del ojo del Collie definido. El intervalo de desequilibrio de ligamiento de anomalía del ojo del Collie definido corresponde a los nucleótidos de 28.603.601 a 28.716.392 (inclusive, tamaño 112.792 pb) de la secuencia del genoma canino montada de dominio público, montaje, julio de 2004. Los sitios de unión del cebador de PCR están en negrita y corresponden a los nombres y las posiciones del cebador enumerados en las tablas 3-5. Las secuencias en minúsculas identifican los nucleótidos delecionados en el alelo mutante; las mayúsculas identifican bases presentes tanto en normales como en mutantes.

La figura 2 es una representación gráfica de las posiciones relativas de la delección de CEA, la SEQ ID NO:1, y los cebadores usados para someter a prueba detectar la delección de CEA, en relación con el intervalo de LD de CEA, y en relación con posiciones en la secuencia del genoma canino montada (montaje julio del 2004). En relación con las coordenadas de la secuencia del genoma canino, se invierten tanto la secuencia de la delección de CEA como de la SEQ ID NO:1.

La figura 3A proporciona la secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO:10) correspondiente a una hebra del producto de amplificación obtenido usando el cebador CEAF21a y cebador CEAR17d. La secuencia correspondiente a CEAF21a está en negrita; la secuencia correspondiente al cebador CEAR17d está subrayada.

La figura 3B proporciona la secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO:11) del complemento inverso de SEQ ID NO:10. La secuencia correspondiente al cebador CEAF21a está en negrita; la secuencia correspondiente al cebador CEAR17d está subrayada. El par de nucleótidos en el recuadro "GC" flanquea el punto de rotura inicial de la delección de CEA.

La figura 4A proporciona la secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO:12) correspondiente a una hebra del producto de amplificación obtenido usando cebadores CEAF22a y cebador CEAR22c. La secuencia de nucleótidos correspondiente al cebador CEAF22a está en negrita; la secuencia correspondiente al cebador CEAR22c está subrayada.

La figura 4B proporciona la secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO:13) del complemento inverso de SEQ ID NO:12. La secuencia de nucleótidos correspondiente al cebador CEAF22a está en negrita; la secuencia de nucleótidos correspondiente al cebador CEAR22c está subrayada. El par encajonado de nucleótidos "GT" flanquean el punto de rotura final de la delección de CEA.

La figura 5 es una representación de una separación electroforética de productos de amplificación por PCR obtenidos usando conjuntos de los cuatro cebadores de PCR dados a conocer en la tabla 6. El primer carril, más a la izquierda, contiene una escala de tamaño. Los carriles restantes se dividen en cuatro conjuntos de amplificaciones por PCR (1-4) de ADN genómico de perros normales (N), portadores (C) y afectados (A). Se realizó el conjunto 1 usando cebadores CEAF22a y CEAR22c. Se realizó el conjunto 2 usando cebadores CEAF21a y CEAR22c. Se realizó el conjunto 3 usando cebadores CEAF21a y CEAR17d. Se realizó el conjunto 4 usando una combinación de los cuatro cebadores.

La figura 6 proporciona la secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO:14) de una hebra del producto de 430 pb generado por PCR usando cebadores CEAF21a y CEAR22c. La secuencia correspondiente al cebador CEAF21a está en negrita. La secuencia correspondiente al cebador CEAR22c está subrayada. Los nucleótidos en el recuadro "GT" flanquean el sitio de delección.

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCIÓN

La presente invención se basa en identificación de la mutación asociada con la enfermedad CEA. Se ha reducido la región crítica en que se ubica el gen de CEA a un intervalo de aproximadamente 100 kb en el cromosoma 37 usando mapeo de desequilibrio de ligamiento. Dentro de este intervalo, se identificó una delección de 7,8 kilobases ("kb") asociada con perros que son heterocigotos para la delección (portadores), o que son homocigotos para la delección (probablemente afectados con CEA). Esta región de 7,8 kb se denomina en el presente documento "la delección de CEA". Sin pretender restringirse a ninguna teoría particular, se cree que la delección de CEA da como resultado la interrupción o eliminación de un elemento potenciador putativo relacionado con la expresión del gen de CEA.

En la figura 1 se da a conocer la SEQ ID NO:1 que se montó a partir de datos recuperados de la base de datos del instituto para la investigación genómica (TIGR) de la base de datos de la secuencia de estudio 1.5 x montada previamente del genoma canino, junto con secuencias amplificadas y secuenciadas en el laboratorio de Elaine Ostrander, por Dayna Akey. El cóntigo creado a partir de estos datos formó la secuencia de consenso para la SEQ ID NO:1.

En más detalle, se montó la SEQ ID NO:1 como una secuencia de 5' a 3' continua en la dirección de la transcripción del gen putativo FLJ12610 como parte de un esfuerzo para identificar la secuencia genómica completa de este gen. La parte de FLJ12610 representada por la SEQ ID NO:1 se presenta en la tabla 1, con intrones y exones también identificados.

Tabla 1

1-519	Extremo de intrón 1 de FLJ12610
520-732	Exón 2 de FLJ12610
733-8.053	Intrón 3 de FLJ12610

8.054-8.191	Exón 3 de FLJ12610
8.192-8.781	Intrón 3 de FLJ12610
8.782-8.840	Exón 4 de FLJ12610
8.841-18.160	Comienzo de intrón 4 de FLJ12610
9.302-17.101	Secuencia delecionada en alelo mutante de CEA

Se transcribe el gen FLJ12610 a partir de la hebra inversa del cromosoma canino 37, como también esta en el cromosoma humano homólogo (HSA2). Por tanto, la SEQ ID NO:1 discurre hacia adelante en la misma dirección que se transcribe el gen FLJ12610, pero hacia atrás en el montaje de genoma canino.

5 La tabla 2 muestra las posiciones genómicas de la zona de desequilibrio de ligamiento de anomalía del ojo del Collie, SEQ ID NO:1, y la deleción de anomalía del ojo del Collie. El nucleótido número 1 en la SEQ ID NO:1 es el complemento inverso del nucleótido 28.694.530 en la secuencia del genoma canino, y el último nucleótido de la SEQ ID NO:1 corresponde al complemento inverso del nucleótido 28.676.370 en la secuencia del genoma canino. Es decir, la SEQ ID NO:1 es el complemento inverso del intervalo de 28.694.530 a 28.676.370 en la secuencia del genoma canino.

Tabla 2

Característica	Posición en el cromosoma canino 37
Inicio de LD	28.603.601
Final de SEQ ID NO:1	28.676.370
Final de Del de CEA	28.677.428
Inicio de Del de CEA	28.685.226
Inicio de SEQ ID NO:1	28.694.530
Final de LD	28.716.392

15 También se han identificado los puntos de rotura de la deleción de CEA. La región delecionada de CEA empieza en el nucleótido 9.302 de la SEQ ID NO:1 que corresponde al nucleótido 28.677.428 del cromosoma canino 37 de la secuencia del genoma canino montada de dominio público, montaje julio del 2004. Por tanto, el punto de rotura inicial de la deleción (también denominado en el presente documento el punto de rotura en el sentido de 5') está entre los nucleótidos 9.301 y 9.302 de la SEQ ID NO:1. La región delecionada termina en el nucleótido 17.101 de la SEQ ID NO:1 y por tanto el punto de rotura final de la deleción (también denominado en el presente documento el punto de rotura en el sentido de 3') está entre los nucleótidos 17.101 y 17.102 de la SEQ ID NO:1. Cuando se deleciona la región de CEA, en una secuencia de 5' a 3' de la región correspondiente a SEQ ID NO:1, el nucleótido 9.301 (G) va seguido por el nucleótido 17.102 (T).

20 Basándose en las observaciones anteriores, se proporcionan pruebas para detectar la presencia o ausencia de la deleción de CEA. Los perros sin la deleción de CEA en cualquier alelo se denominan normales para CEA. Los perros con la deleción de CEA en sólo un alelo se denominan portadores de CEA. Los perros homocigotos para las deleciones de CEA se denominan afectados con CEA.

25 Pueden llevarse a cabo pruebas para detectar la deleción de CEA en cualquier muestra que contiene ADN genómico. Por ejemplo, puede obtenerse una muestra de sangre, pelo, bazo, raspados de mucosa, semen, biopsia de tejido, saliva o similares. En una realización, la muestra biológica es sangre.

30 Puede determinarse la presencia o ausencia de la deleción de CEA usando una variedad de técnicas que se conocen bien en la técnica. Por ejemplo, puede amplificarse ADN genómico para su uso en pruebas enzimáticas a través del uso de PCR (Saiki *et al.* Science 239:487-491 (1988)) u otros métodos de amplificación *in vitro* tales como la reacción en cadena de la ligasa (LCR) (Wu y Wallace Genomics 4:560-569 (1989)), amplificación por desplazamiento de hebra (SDA) (Walker *et al.* PNAS USA 89:392-396 (1992)), replicación de secuencia autosostenida (3SR) (Fahy *et al.* PCR Métodos Appl. 1:25-33 (1992)), antes de análisis de deleción de CEA. Las técnicas para preparar ácidos nucleicos en una forma que es adecuada para someter a prueba la deleción de CEA se conocen bien en la técnica.

Puede efectuarse la detección de la presencia o ausencia de la delección de CEA en ADN mediante una variedad de métodos incluyendo, pero sin limitarse a, reacción en cadena de la polimerasa (PCR), hibridación *in situ* fluorescente (FISH), hibridación con sondas de oligonucleótidos específicas de alelo (Wallace *et al.* Nucl Acids Res 6:3543-3557 (1978)), incluyendo oligonucleótidos inmovilizados (Saiki *et al.* PNAS USA 86:6230-6234 (1989)) o matrices de oligonucleótidos (Maskos y Southern Nucl Acids Res 21:2269-2270 (1993)), PCR específica de alelo (Newton *et al.* Nucl Acids Res 17:2503-2516 (1989)), detección de reparación de apareamiento erróneo (MRD) (Faham y Cox Genome Res 5:474-482 (1995)), electroforesis en gel en gradiente de desnaturalización (DGGE) (Fisher y Lerman *et al.* PNAS USA 80:1579-1583 (1983)), detección de polimorfismos de conformación de una sola hebra (Orita *et al.* Genomics 5:874-879 (1983)), escisión química (Cotton *et al.* PNAS USA 85:4397-4401 (1988)) o enzimática (Youil *et al.* PNAS USA 92:87-91 (1995)) de ADN heterodúplex, métodos basados en extensión de cebador específico de alelo (Syvanen *et al.* Genomics 8:684-692 (1990)), análisis de bit genético (GBA) (Nikiforov *et al.* Nucl Acids Res 22:4167-4175 (1994)), el ensayo de ligación de oligonucleótidos (OLA) (Landegren *et al.* Science 241:1077 (1988)), la reacción en cadena de ligación específica de alelo (LCR) (Barrany PNAS USA 88:189-193 (1991)), LCR de espacio vacío (Abravaya *et al.* Nucl Acids Res 23:675-682 (1995)), y secuenciación de ADN fluorescente y/o radioactiva usando procedimientos convencionales bien conocidos en la técnica.

En una realización, se realiza la amplificación de ADN genómico para someter a prueba para detectar la delección de CEA mediante PCR. Para esta realización, se proporcionan cebadores de PCR y un método para usar los cebadores en reacciones de amplificación de manera que se observan combinaciones diferentes de productos de amplificación cuando se amplifica ADN de perros afectados, portadores o normales.

En una realización, se realizan pruebas para detectar la delección mediante PCR usando un conjunto de cuatro cebadores. Los cebadores se diseñan de manera que cuando se usan los cebadores primero y segundo para amplificar ADN de un alelo de cromosoma 37 normal, se produce un primer producto de amplificación que abarca el punto de rotura inicial (punto de rotura en el sentido de 5') de la delección de CEA. Se diseñan los cebadores tercero y cuarto de manera que cuando se usan para amplificar ADN de un alelo de cromosoma 37 normal, se produce un segundo producto de amplificación que abarca el punto de rotura final (punto de rotura en el sentido de 3') de la delección de CEA. Se diseñan los cebadores primero y cuarto para unir a sitios presentes adyacentes a la zona delecionada en el cromosoma de la enfermedad. Se diseñan los cebadores segundo y tercero para unir a sitios presentes dentro de la zona delecionada en el cromosoma de la enfermedad.

Ni el conjunto de los cebadores primero y segundo, ni el conjunto de los cebadores tercero y cuarto, amplificarán un producto de un cromosoma 37 que tiene la delección de CEA porque no hay ningún sitio de unión presente para los cebadores segundo o tercero. La amplificación usando el primer cebador y el cuarto cebador no producirá un producto de amplificación de un cromosoma 37 normal porque está más allá de las limitaciones técnicas de las reacciones de amplificación empleadas en el presente documento para amplificar y detectar la secuencia de 7,8 kb (no delecionada) presente en el cromosoma normal. Sin embargo, cuando está presente la delección de CEA, los sitios de unión para los cebadores primero y cuarto se colocan en proximidad suficiente entre sí en el/los cromosoma(s) con la delección de CEA de manera que se produce un tercer producto de amplificación. Por tanto, el tercer producto de amplificación no contiene ninguna parte de la delección de CEA.

Se proporciona un ejemplo de un conjunto de cebadores en el que el primer cebador está aguas arriba o en el sentido de 5' del punto de rotura inicial de la delección de CEA y el segundo cebador está dentro de la delección de CEA pero en proximidad suficiente al sitio del primer cebador de modo que puede producirse un producto de amplificación que abarca el punto de rotura inicial de la delección de CEA. El tercer cebador está dentro de la delección de CEA y el cuarto cebador está aguas abajo o en el sentido de 3' del punto de rotura final de la delección de CEA. El tercer y el cuarto cebadores están en proximidad suficiente de manera que se produce un producto de amplificación que se extiende sobre el punto de rotura final de la delección de CEA. Los sitios de cebadores primero y cuarto están suficientemente separados de modo que cuando no se deleciona la región de CEA, estos dos cebadores no producirán ningún producto de amplificación.

Los expertos en la técnica reconocerán que las designación de los cebadores como primero, segundo, tercero y cuarto es arbitraria y se usa en el presente documento por claridad en referencia a los productos de amplificación generados usando los pares de cebadores particulares. También se reconocerá que, mientras se proporcionan en el presente documento secuencias particulares de cebadores de PCR, pueden diseñarse otras secuencias de cebadores de PCR por los expertos en la técnica para detectar la presencia o ausencia de la delección de CEA. Además, pueden diseñarse los cebadores para amplificar cualquier hebra del cromosoma 37 en la región de la delección de CEA.

Pueden llevarse a cabo reacciones de amplificación usando los cuatro cebadores en la misma reacción o puede llevarse a cabo la amplificación de cada grupo por separado. Por tanto, también pueden realizarse amplificaciones secuenciales o simultáneas del ADN genómico en reacciones separadas usando los cebadores primero y segundo, los cebadores tercero y cuarto, y los cebadores primero y cuarto. Sin tener en cuenta si las amplificaciones se realizan por separado o en combinación, los resultados combinados de las amplificaciones usando los tres pares de cebadores mencionados anteriormente se interpretan como sigue:

- 1) La presencia de sólo los productos de amplificación primero y segundo es indicativa de un perro normal.

2) La presencia de los productos de amplificación primero, segundo y tercero es indicativa de un perro portador.

3) La presencia de sólo el tercer producto de amplificación es indicativa de un perro afectado.

5 Por tanto, usando la combinación de pares de cebadores descrita en el presente documento, el perfil del producto de amplificación por PCR obtenido de una muestra biológica indica el estado de CEA del perro como normal, portador o afectado.

10 Cuando se usan cebadores de PCR de manera que los productos de amplificación son de tamaños diferentes, pueden analizarse los productos de amplificación mediante métodos convencionales tales como separación y detección electroforética usando bromuro de etidio y luz ultravioleta, o cualquier otro método de detección adecuado. Alternativamente, pueden aislarse y secuenciarse los productos de PCR.

El método de la presente invención puede llevarse a cabo para cualquier raza de perro. En general, perros que se conoce que se ven afectados por CEA incluyen Rough y Smooth Collie, Border Collie, pastores australianos, Lancashire Heeler, y perro pastor de Shetland.

15 También se proporcionan en la presente invención kits para detectar la presencia de la delección de CEA en una muestra biológica de un perro o una muestra de ácido nucleico extraído de la muestra biológica. Los kits de la presente invención comprenden reactivos para la detección basada en ácido nucleico de la presencia de la delección de CEA. En una realización, los kits comprenden reactivos para extracción/preparación de muestras de ácido nucleico, pares de cebadores para la amplificación de regiones que abarcan el punto de rotura inicial y punto de rotura final de la delección de CEA y pares de cebadores para la amplificación de una región que abarca la región generada por la delección de la región de CEA.

20 Usando las herramientas y el método descrito en el presente documento, pueden identificarse perros que son genéticamente normales, heterocigotos para (delección en un alelo), u homocigotos para (delección en ambos alelos) la mutación principalmente responsable de la anomalía del ojo del Collie (CEA). Tras la identificación, tales perros pueden eliminarse del pie de cría. Alternativamente, los perros que son heterocigotos para el alelo de CEA pueden aparearse con perros genéticamente normales para garantizar la ausencia en la camada de perros afectados con CEA.

La invención se comprenderá adicionalmente mediante los siguientes ejemplos, que pretenden ser ilustrativos y no restrictivos de ninguna manera.

EJEMPLO 1

30 Este ejemplo demuestra que pueden distinguirse perros que son genéticamente normales, heterocigotos para, u homocigotos para la mutación principalmente responsable de CEA usando el método de la presente invención. En particular, se usan combinaciones de cuatro cebadores en reacciones de PCR para producir productos de amplificación característicos de perros que son genéticamente normales, heterocigotos para, u homocigotos para la mutación principalmente responsable de CEA. En la figura 2 se proporcionan las posiciones de unión de los cebadores en relación con la SEQ ID NO:1, la delección de CEA y el intervalo de desequilibrio de ligamiento de CEA (LD).

35 La figura 3A proporciona la secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO:10) correspondiente a una hebra del producto de amplificación obtenido usando el cebador CEA21a y el cebador CEAR17d. La figura 3B proporciona la secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO:11) del complemento inverso de SEQ ID NO:10. En el complemento inverso, el par de nucleótidos en el recuadro "GC" flanquea el punto de rotura inicial de la delección de CEA. Es decir, en la hebra inversa de la CFA (*Canis familiaris*) del cromosoma 37 la G no está delecionada, pero la C es el primer nucleótido delecionado en el alelo mutante. La tabla 3 proporciona información adicional acerca de las posiciones de unión relativas de los cebadores CEA21a y CEAR17d.

Tabla 3

Cebador	CEAF21a	CEAR17d
Secuencia	GGAGGAGTCATCATGACTTGC (SEQ ID NO:2)	GACTGGTATTATCAAAGGTCAC (SEQ ID NO:4)
Complemento inverso de secuencia	GCAAGTCATGATGACTCCTCC (SEQ ID NO:3)	GTGACCTTTGATAATACCAGTC (SEQ ID NO:5)
Secuencia de sitio de unión, en SEQ ID NO:1	GGAGGAGTCATCATGACTTGC (SEQ ID NO:2)	gtgacctttgataataaccagtc (SEQ ID NO:5)
Ubicación en relación	9213-9233	9495-9474

con SEQ ID NO:1		
Ubicación en relación con INICIO de delección de CEA	-89 a -69	+194 a +173
Ubicación en relación con secuencia del genoma canino montada	Cro 37: 28.685.296-28.685.315	Cro 37: 28.685.033-28.685.054

5 La figura 4A proporciona la secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO:12) correspondiente a una hebra de un producto de amplificación obtenido usando cebadores CEAF22a y cebador CEAR22c. La figura 4B (SEQ ID NO:13) proporciona el complemento inverso de SEQ ID NO:12. En el complemento inverso, el par de nucleótidos en el recuadro "GT" flanquea el punto de rotura final de la delección de CEA. Es decir, en la hebra inversa de CFA 37, la G es el último nucleótido deleccionado y la T no está deleccionada en el alelo mutante. La tabla 4 proporciona información adicional acerca de los sitios de unión relativos de cebadores CEAF22a y CEAR22c.

Tabla 4

Cebador	CEAF21a	CEAR22c
Secuencia (directo)	TGTCCTCCGTACCATCGTGT (SEQ ID NO:6)	CTAGTCTGTCAATAGCACCACTA (SEQ ID NO:8)
Complemento inverso de secuencia	ACACGATGGTACGGAGGACA (SEQ ID NO:7)	TAGTGGTGCTATTGACAGACTAG (SEQ ID NO:9)
Secuencia de sitio de unión, en SEQ ID NO:1	TGTCCTCCGTACCATCGTGT (SEQ ID NO:6)	TAGTGGTGCTATTGACAGACTAG (SEQ ID NO:9)
Ubicación en relación con SEQ ID NO:1	16739-16758	17420-17442
Ubicación en relación con FIN de delección de CEA	-363 a -344	+341 a +319
Ubicación en relación con secuencia del genoma canino montada	Cro 37: 28.677.770-28.677.789	Cro 37: 28677088-28677110

10 Para distinguir perros normales, portadores y afectados con CEA, se usaron los cebadores dados a conocer en la tabla 3 y 4 (y que se resumen en la tabla 5) como sigue.

Tabla 5

Cebador	Secuencia	Sitio de unión	Ubicación
CEAF21a	GGAGGAGTCATCATGACTTGC (SEQ ID NO:2)	GGAGGAGTCATCATGACTTGC (SEQ ID NO:2)	9213-9233
CEAR17d	GACTGGTATTATCAAAGGTCAC (SEQ ID NO:4)	gtgaccttgataataaccagt (SEQ ID NO:5)	9474-9493

CEAF22a	TGTCCTCCGTACCATCGTGT (SEQ ID NO:6)	tgtcctccgtaccatcgtgt (SEQ ID NO:6)	16739-16760
CEAR22c	CTAGTCTGTCAATAGCACCA CTA (SEQ ID NO:8)	TAGTGGTGCTATTGACAGACTAG (SEQ ID NO:9)	17420-17442

5 CEAF21a es un cebador directo y designado en el presente documento primer cebador, CEAR17d es un
 cebador inverso y se designa en el primer documento segundo cebador. CEAF22a es un cebador directo y se designa
 en el presente documento tercer cebador y CEAR22c es un cebador inverso y se designa en el presente documento
 10 cuarto cebador. Se realizaron tres conjuntos de cebadores para pruebas de PCR tal como se representa en la tabla 6
 (columnas “n.º de prueba de PCR” y “cebadores”). Se usaron estos conjuntos de cebadores para amplificar ADN
 genómico extraído de muestras de sangre de canino mediante el método de fenol-cloroformo (Sambrook *et al.* 1989). En
 estudios iniciales, se usó ADN de 3 perros seleccionados cuyos estados genéticos de CEA (afectado, normal o portador;
 15 columna de “estado de CEA”) se había determinado previamente mediante estudios de cría experimentales. En estudios
 posteriores, se usó ADN en un conjunto de muestras más grande que representaba más de 20 perros de cada genotipo
 (afectado, normal o portador), para los que se había establecido previamente el genotipo que mediante estudios de cría
 experimentales. Todas las amplificaciones usaron el mismo programa de PCR: 96°C durante 2 minutos; 30 ciclos de
 96°C (20 segundos), 58°C (20 segundos), y 72°C (40 segundos); y una extensión final a 72°C durante 5 minutos. Se
 analizaron productos de PCR mediante electroforesis a través de un gel de agarosa al 1,5% (figura 5). La asignación de
 fenotipos se basó en la presencia o ausencia de productos de PCR de tamaño particular tal como se enumera en la
 columna “producto de PCR esperado”. La prueba de PCR número 4 usó los cuatro cebadores simultáneamente.

Tabla 6

N.º de prueba de PCR	Cebadores	Estado de CEA	Producto esperado
1	CEAF22a	Afectado	Ninguno
	CEAR22c	Normal	704 pb
		Portador	704 pb
2	CEAF21a	Afectado	430 pb
		Normal	Ninguno
	CEAR22c	Portador	430 pb
3	CEAF21a	Afectado	Ninguno
	CEAR17d	Normal	283 pb
		Portador	283 pb
4	CEAF22a	Afectado	430 pb
	CEAR17d	Normal	283 pb
			704 pb
	CEAF21a	Portador	283 pb
			430 pb
			704 pb

20 Tal como se muestra en la tabla 6 y la figura 5, para la prueba 1 de CEA (cebadores CEAF22a y CEAR22c) no
 se amplifica ningún producto del afectado (A), pero se amplifica un producto de 704 pb tanto de normal (N) como de
 portador (C). Se obtiene este resultado porque, en las muestras N y C, hay al menos una copia del alelo de CEA normal
 en el que los sitios de unión de cebadores CEAF22a y CEAR22c están separados por 704 pares de bases (pb). Sin
 embargo, el sitio de unión de CEAF22a se encuentra dentro de la región de ADN que se deleciona de ambos alelos en

los animales afectados, por tanto no hay ningún sitio de unión para CEAF22a presente en el cromosoma mutante y no puede detectarse ningún producto de amplificación. Las secuencias de cada hebra del producto de 704 pb generado por PCR usando cebadores CEAF22a y CEAR22c se dan a conocer en las figuras 4A y 4B.

5 Tal como se muestra en la figura 5, para la prueba 2 de CEA (cebadores CEAF21a y CEAR22c) se amplifica un producto de 430 pb tanto de afectado (A) como de portador (C), pero no se amplifica ningún producto de normal (N). Se obtiene este resultado porque, en perros tanto afectados como portadores, hay al menos un alelo con la delección de CEA. La delección yuxtapone los sitios de unión de cebadores CEAF21a y CEAR22c de manera que se separan por 430 pb en el alelo mutante. Sin embargo, en el alelo normal (no se observa ningún producto de PCR), los sitios de unión de cebadores CEAF21a y CEAR22c están separados más de 7.800 bases. Por tanto, el producto teórico del ADN normal es demasiado grande para amplificarse y/u observarse en las condiciones de prueba descritas usando los cebadores CEAF21a y CEAR22c. Se proporciona la secuencia de una hebra del producto de 430 pb (SEQ ID NO:14) generado por PCR usando cebadores CEAF21a y CEAR22c en la figura 6 en la que los nucleótidos en el recuadro "GT" se yuxtaponen debido a la delección.

15 Tal como se muestra en la figura 5, para la prueba 3 de CEA (cebadores CEAF21a y CEAR17d), no se amplifica ningún producto del afectado (A), pero se amplifica un producto de 283 pb tanto de normal (N) como de portador (C). Se obtiene este resultado porque, en las muestras N y C, hay al menos una copia del alelo de CEA normal, y los sitios de unión de cebadores CEAF21a y CEAR17d se separan en el alelo normal por 283 pb. Sin embargo, el sitio de unión de CEAR17d se encuentra dentro de la región de ADN que se deleciona de ambos alelos en el fenotipo afectado, por tanto no hay ningún sitio de unión para CEAR17d y no puede detectarse ningún producto de amplificación. Se da a conocer la secuencia de ambas hebras del producto de 283 pb generado por PCR usando cebadores CEAF21a y CEAR17d en las figuras 3A y 3B. Pruebas posteriores han confirmado que la longitud indicada del producto de 283 pb es correcta a pesar de su migración aparente como un producto más largo en la figura 5.

25 En la prueba 4 de CEA, todos los cebadores para las pruebas 1 a 3 se multiplexan, produciéndose cada uno de los productos de PCR presentes como cuando se realizan las pruebas con los conjuntos individuales 1-3. Tal como puede observarse a partir de la prueba 4, sólo se amplifica un producto (430 pb) del afectado (A), mientras se amplifican un producto de 283 pb y uno de 704 pb del normal (N); y se amplifican los 3 productos (283, 430 y 704 pb) de la muestra del portador (C) cuando se usan los cuatro cebadores.

Por tanto, este ejemplo demuestra que, usando el método de la presente invención, pueden identificarse perros que son normales en el locus de CEA, o que son heterocigotos para, o que son homocigotos para la mutación de CEA.

30 Aunque esta invención se ha ilustrado mediante realizaciones específicas, modificaciones de rutina serán evidentes para los expertos en la técnica y se pretende que tales modificaciones estén dentro del alcance de la invención y las siguientes reivindicaciones.

LISTA DE SECUENCIAS

	<110>	Acland, Gregory
5	<120>	Prueba de diagnóstico para la anomalía del ojo del Collie
	<130>	18617.0109
	<150>	Documento US 60/620.547
10	<151>	20-10-2004
	<160>	14
	<210>	1
15	<211>	18160
	<212>	ADN
	<213>	<i>Canis familiaris</i>
	<400>	1

gtgtattcac	atcaaccagc	ttgtgggctt	gtaggtggcc	aaggagggtc	50
agatcagggt	gagacaattc	cagcgaatgg	cctgcccttc	cacctaaagc	100
cctgggatct	ttccatattt	ctgtccttgt	ttgttttttg	cgctgcccac	150
agtacaaggt	aggattgtga	agtaggccag	ttgtctcttc	tgtgttcttc	200
tttcctcttc	ctgtttattt	ttcttaaaga	ttttatttat	ttatttatga	250
gaggcacaga	gagaggcaga	gacataggca	gaggaacaag	caggetcccc	300
atagggaggg	actcgatccc	aggaccccg	gatcaccacc	tgagctgaag	350
gcagatgctc	aaccactgag	ccacctgggt	gccccctctt	cctgcttttt	400
tgtcttctct	tcatctccac	tgcgctgtct	tcatgttagc	cagagttttc	450
ctttactgtt	gaggggagtc	tgtttccttg	ttacaccccg	actccataca	500
actcctgctg	tcttttttagg	agctgaacaa	gcgcctgaca	gctccacctg	550
cggcttttct	ctgtcatttg	gatgatctgc	ttcgccact	gttgaaggac	600
actactttcc	ccagcgaagc	tatgttcacc	tgtgatcatg	tggccgaggc	650
actgatacta	cgggtgcgga	gtgaactctc	tggctctccc	ttttatttga	700
atttccactg	cattcctgct	agcccttccc	tggtgagtgt	aattcaagtg	750
tggagtgggg	aaggggaatg	ccagctgctt	caagatgaat	ctttagggtg	800
tcttattttt	gtgtggatto	cacttgaaat	tcttcttcag	tcagaacact	850
ttccttgatt	agacagaagg	caaaacagat	tctcgactgg	tacatctttt	900
ccttgcaaag	ggagcagggg	ttgggtttac	ctgctttatt	gagcgtcttt	950
aatattcaac	atttattaag	catcacttta	ggctggttgt	taggtgtcca	1000
gatctaaaac	aatagccta	ttcctggagt	ttataatcta	gtgagaagat	1050
agacaggaag	cagaataaag	tatggtaaag	tctttggttg	aagtaagctc	1100
aggatgagtg	aaagtgtgaa	aaaccttttt	ttgaagagag	tttttttttt	1150
cctttagaaa	gtggaggggg	aggggaagag	ggagagagag	agagagagag	1200
agaaagagag	agagagaatc	ccaagcaggc	accatgcccc	acaggagagg	1250
caacatgggg	ctcaatctta	caaccctgag	atcatgacct	gggccgaaat	1300
caagagtgtg	gtgtttcacc	gactgggcca	ctgaggcacc	ccattgaaga	1350
gatagtttct	aagtgtgtgt	ttggagatga	ggaggggata	accgggagaa	1400
gatcagggtc	gtctaggctg	gagtgcattt	tgagaggcag	ggagatgtat	1450
aggtatgggg	caagggaggg	aatttcatga	ctgcaggaag	ttgtgggaaa	1500
tgaggtgggc	attttgaaga	attctaata	gtttggattt	tatccttaag	1550
gcaacagaga	ttcattgaaa	aagtttattt	tattattaga	aaatatttaa	1600
tttattttat	tgagagagta	agagccagag	agatcagagg	gagagggaca	1650
gggaaaagca	ggcttgctgc	tgaacagaga	tcccagtggt	gggcttgatc	1700
tcaggaccct	gagtcatgac	ctgagctgaa	ggcagacgct	taaccgactg	1750
agccaccag	gtgcctgcat	tgaaaaaact	taagcagggg	tttaacatga	1800
tccagttcag	atcagtctgg	caaaggatag	agtacgtgcc	agtgttagct	1850
acctttctga	acatttgtca	ttggatcttc	atgactatcc	tgcaagataa	1900
gtagtattta	ttccttggtt	tcagagtagg	aagccaagat	tgaaggcaat	1950
tggtccaaag	tcatctaact	tgtaaagtga	tgagctggaa	ttttactccc	2000

agggaggtct	gattcgagag	cctattttca	aggactagga	tgataatgtc	2050
ttctgcttac	acagctttct	aggcttccag	agcttttatt	ttttattttt	2100
ttaaagattt	atthatttag	ttatgataga	cacacacaca	cacacacaca	2150
cacacacaca	cacacacaca	cacagaagca	gagacacagg	cagagggaga	2200
agcaggctcc	atgctgaaag	cccgatgtgg	gactcgatcc	caggactcca	2250
ggatcgtgcc	ccgggccaaa	gacagggccc	aaaccgctga	gccaccacag	2300
gatccctccc	agagctttta	ttagaaatta	gtttgacatg	ggagacacct	2350
aactctggga	aaggggtagt	ggaaaaggag	gtgggtgggg	gggtgggggtg	2400
actgggtgac	gggcactgag	gagggcactt	ggcaggatga	gcactgggtg	2450
ttatgctaaa	tggtgacaag	ttgaactcca	ataaaaaaaaa	ttaaaaaaaaa	2500
ttagtttgag	agagacgctg	gggtgactca	gtgggtgagc	atctcccttc	2550
agctcagggtc	atgatcctgg	ggctctggga	tcgagtccca	cattggcttc	2600
cccacaggga	gcctgtttct	ccctctgcct	gtgtctctgc	ctttctctgt	2650
gtctctcata	aataaatgag	taaaatcttt	aaaaaaaaata	attagtttga	2700
gagtaaacag	taagaacttg	tttgcaagaa	ttactgccac	tggtcccttc	2750
caccctttta	tataaacaga	gctgtttcag	tcagtagcat	tagaggccaa	2800
ggtcttctat	gggaggccta	aggggtgtagg	tttatcagca	gaagcacttg	2850
aagacaagtg	ggcatcattt	cctatatact	ttcttttagt	ttcctgaggt	2900
catgtgatct	ttgggcacca	acggagtggg	tgggaccaag	tatttttgag	2950
aaactgttct	ttggtggatt	tcttttctta	agatttattt	atttatttga	3000
gagagagaga	gtgtgtgtgt	gtgtgggttg	gagggacagg	gcgagggaga	3050
gagagtctca	agcgactcca	cgttgagcac	cgagcccaat	gcggggcttg	3100
atgccatgac	ccttaactga	aaccaagagt	cagaggctca	actgactgta	3150
ccaccaggt	gcccctctgg	tggagttttg	atttggaatc	cagtaaagggt	3200
ggacttgagt	gcttgagaaa	cttctcatte	atctctgaat	ttctgaggtc	3250
catcaacagt	gtttagcaga	taatagtttt	gatctgttga	ttttcgtgaa	3300
atttttttgt	gcaatttttc	atcctttaga	tagtttacct	ctgggtcaaa	3350
tccctgtaat	tttttcttaa	gtaacaccag	ggggcactgt	tccctcaata	3400
atgcttggtc	tggaaacaaa	aaaaaaaaaa	aaaaaaaaag	tggtccggga	3450
gcccttggga	agtcctagca	atagctagtc	tcattgtgca	tcacacagcc	3500
ctcgaaattc	agaatagtga	gattgagaag	gtagtcttag	gaggggtgatg	3550
ggctctgata	gtttttttcc	ccccaaatta	aaaggaaact	tgtataatga	3600
tattatacta	gaaaataata	tgtaaaggga	aaacgagcta	ttctaggcaa	3650
attcctctaa	ttgggcagcc	ccaataagaa	aagaagcttc	agtattgggg	3700
agaccattga	acaatttggt	aacaattagg	ctttaaggta	aaataaaata	3750
tgtattatta	taaaaaagaa	gactaccagc	ccagggaaac	ccctgagcct	3800
gaggaagctt	tatagggaag	aagttagagc	cagcggacac	tgtcaaggat	3850
gtaggcggat	actattccag	gcttggtgtg	gtgtctgtga	ggtcacacag	3900
tcataatttt	tgttttattac	tcattcttgt	gatagttttt	atttcatttt	3950
ttttcaatga	gtaattcatg	caaaaggcaa	acatttcaaa	tagcattaag	4000
aaagggtcta	gagtgaaaaa	ataggctcct	ctactccacc	ctctagtctg	4050
ttatttttct	ttcttaaaag	aactactgat	accatcttct	tgtgacttct	4100
taagggaagc	tatacttagg	tttggtgaga	tgtaagtatg	tgtgtactca	4150
cacaatcaaa	tacttatctg	ggcgtatgga	tgccctttca	caaatggcag	4200
catactatcc	acactattca	gtagcttgct	cttttcactt	aattatagaa	4250
cttagaaaa	atttgtaaca	atctgcttgg	acaatctgct	ttaatattct	4300
ttaatggtaa	catagagttt	tatttgatgg	catatatcaa	cttgatttga	4350
atcgatacac	tactagtaga	tacttaagtt	gtttccattc	ttttgctgtt	4400
acacatagt	gctactcttg	tattttacttt	tcctacgtgt	aaatgtaaga	4450
gtaactttct	agcaatggaa	tagttgaatc	aaggagtatt	tgggggctcc	4500
tggatggctc	ggtcggaagg	gcgtgcaact	cttgatctca	gggtcgtgag	4550
tctgagcccc	acatcagggt	tagagattgc	tcaaaaaaat	aaataaacia	4600
atgtaaaaa	aaggagtatt	tgtatcatta	atattgctca	caataatgcc	4650
agattgtctc	tcagagagct	tgacacacta	aactcctact	agccatgcag	4700
gagagtaaga	gaatacacgc	tgtgggtgtg	tcacgccaa	atctcaaggc	4750
tgtgcaggat	atcatgaaat	atctcaagcc	tcagatttct	gctttctagc	4800
ccatttccac	ttccagccag	cttccttcat	tccttcttcc	tcctcaaaaa	4850
tgaaggagtc	caagtatgtg	ctcgcaatga	cttatccaag	gtaatagaaa	4900
tcgagtgtgt	gagctgagtt	acaaaagcat	gtgtgttctt	cctgccacac	4950
aaaaaaccgc	ttgtattacc	ttggataagt	cattgaattt	ttatgagact	5000
tggcttcac	attgataaag	aggaggcacc	agtcccaacc	ttactatgga	5050

atcctgggga	ctaaatacga	gaacatacat	agtagtactt	agcttcagca	5100
ttactgtgga	cctttgagaa	cacatactcg	gactccctaa	tttttccttg	5150
aagaaaataa	gggcccgtgag	agtgccttggg	attaagccat	tttcacatct	5200
agatgctctc	agagccaggg	ctagaatcca	gatggaattt	ccagtctgtt	5250
gctcttgtca	ccatatccaa	acctgatagg	attcattttg	ggattgataa	5300
ctgccattca	gctctcctgc	ctctgactgt	caacatttca	atgggaaatc	5350
tgcagatgtc	aggggtgggg	gtgggggtgg	gaggggtgta	taaatagatt	5400
tcctctggaa	aagattgaca	actcctgctt	ctgtatctac	cacacttcct	5450
gacctcctta	actctcctga	gaaatttgag	agcagaagcc	tcattgggttc	5500
acagcatgta	ctaggcacat	agtaggtgtc	tgttgaattg	gcttgtggaa	5550
tcgcacctct	tcatatatca	tcgtctgcaa	acgaaggggt	gggggtcttc	5600
ctgacctgaa	gtgcttcaa	atttttcctt	gaaaatcctt	gaagtatctg	5650
tggatttgct	ttgaaatcta	ttacttcagc	cacatgactt	gtcctaatta	5700
attgtcctaa	gcattgcatt	aacttggaaa	tgagttatac	cccaatgatt	5750
cagagtgggtg	tagtccaatt	ctatgaaatt	atttgaaaag	ttgagatatt	5800
tactgagaaa	aagctaaatt	attttttctt	tgttgctata	tagacattgg	5850
cgtctggtac	atagcttcgg	gtgcctggca	tggcattact	ttattttatt	5900
atttattttat	ttattttatt	atttattttat	tattattttt	aatgatagtc	5950
atcacagaga	gatagagaga	gagagagagg	cagagacaca	ggcagaggga	6000
gaagcaggct	ccatgcaccg	gggagcccg	cgtgggactc	gaccccggtt	6050
ctccaggatc	gccccttggg	ccaaaggcag	gcgttaaacc	tctgcgccac	6100
ccagggatcc	ctaccctata	tatttagata	cagcattgat	taaaagctgt	6150
ttctccttat	gtttcctgtt	tatttaccac	cactcaaaga	gatcgctgtt	6200
aagggtggatt	cccagagaga	ggctggttgt	cacctttagg	agtttctgtt	6250
atltgagggc	tgccgccaga	gggatgggtga	tgtctgttgg	ttaccaattg	6300
caattacttt	cagtttcagcc	cctctaaaca	cggacttgct	ttcatacaag	6350
gattcaccta	tttttccact	attcacctcg	aacaggacaa	aacctaaaca	6400
aatagtctct	aggaaagaag	gttgggtctg	gagcagatga	atttccccaa	6450
agcagaactt	ctgctgcatt	ttgaacagta	tttggaggct	tcagtttatc	6500
cttaggacct	gaactgggaa	ccaggaccag	gttgggatgt	gctgcatgat	6550
gggaagaagt	gactgggtgt	tccagctcca	tttgacttct	ggccttctgc	6600
tctgcatcag	ccccctgca	tttattgggt	cctgggtggg	gtacaaaagc	6650
tgtctgcctc	cgcccgatc	cccctcaccc	caatctcttc	tcttctgatc	6700
tgctcctaga	gaagcgtagg	ggtgcctata	atatggccag	ttggccaact	6750
ctggcttgct	gcctattttt	ctgaaattat	gttggaaacc	cactaccctc	6800
atlttattaca	tgttgtctat	gggcattttc	atgaagtaac	agcagagttg	6850
agtattgtga	caggggctgt	attggctgta	gagctgaaaa	tattgactat	6900
ctgacccatg	cagaaaatgt	tgctgacctc	tgatctcggg	cctttctttt	6950
taatgtttcc	tttagctcat	ctccttgggg	aatgtgaagg	aaaccttgat	7000
agcatccttt	ggtcacaaa	aaattattga	ttttattttat	ttattttatt	7050
ttaaaagatt	gtattttatt	atttattttat	ttattttatt	atttattttat	7100
ttattttgaca	cagagagaga	gtacatgcac	aagtaggcag	agcggcaagc	7150
agaggagaga	gggagaagca	ggctccctgc	tgagtagaga	gccagtagc	7200
ggatcatgac	tctctgagcc	aaaggcaaag	acagactctt	aactgactga	7250
gccacacagg	tgtctcgaga	tgattgatta	tagttatttt	ccttggctaa	7300
ggctcttttc	tttctaagac	tactggatac	cctgtgtagg	tgaattagggt	7350
aattattcta	tataggtata	tgttgttata	tgagaacagc	atcctagttg	7400
cacagcagca	tggctatgct	tatgtccttc	ttaccttggt	aagagcaagg	7450
tgtgctgggc	cagtttcatc	cttcttaggc	tgacctcttg	gtgactggct	7500
ggcttctgtt	ccgatgacct	tagactttgc	tgcatttggt	ggagcagatc	7550
gaaactctca	ttctggacta	tcattcagccc	tgaaatggct	tgtaagcagt	7600
ggctgggtct	aatttccaag	gctttctgct	ctctgttgac	ttttgtcttc	7650
tgttatgtgc	cagctagcac	actcttttaa	ctacacctac	tttctgaag	7700
cctacttggga	ttttctgctt	ttgttagtct	ctgcaggaga	gttggaaaca	7750
cacctttctc	ttatcaactc	tgttacaacc	ttctctttta	atcaccactc	7800
tgggtgtgct	atccatgtgt	tctcctctct	tcttccacc	ccttttatcta	7850
tgttacaaa	aaagccctcg	aacttctttc	acatacctat	ttagttactg	7900
tattttttata	gccatgtaaa	tggattgctt	gcttatgaaa	ctgtaagtc	7950
ctgtgaaaac	atatattttt	cagtattttt	ctagttccta	atatagtgtt	8000
cgggagtact	ctgtaactgt	ctggtggctg	attgatattc	cctccatgaa	8050
aggtctccca	gcatttgggt	cgtcctctca	tgggcatgag	tctggccttg	8100

cagtgccaa	tgagggaact	agcaaccttg	cttcgcatga	aagatctaga	8150
gatccaggac	taccaggaga	gtggggctgt	gctgagtcga	ggtgagaggg	8200
cattcttttg	gggtgttggg	tggggactgg	tacagggtgc	caaagggcct	8250
cagaaaatgg	gagagtcatt	tgcattagag	gtgtgcttcc	ctgaggaggt	8300
gctgggtact	gaccataact	ggagacttga	ggctgggtga	tacttctctc	8350
tgccctgatg	acccagctgg	catccaagta	gccaaaagaa	actgtagctg	8400
agtccagcca	ttgccccagg	caatggcaag	gaaagagttt	ggaaaggggc	8450
caacagttgt	gcaaaactgt	acgagggcag	cacaaacata	gggtgggacc	8500
ctatgaagca	tagctccagc	ttcagaataa	aaattcagtt	cgaccttcgt	8550
ctttgtggcg	ggatgaactc	ctagagcaca	tgctgccact	gaacacatcc	8600
tgtgttgcta	atcacccctc	cctcctcctc	tgtttgctca	cacactcatc	8650
ccttctccca	ctggactccg	ggtgttacat	gtttatgctc	cctaccaaga	8700
aatcttgggc	tctgtttctt	ttccttctca	caggcagaaa	gctcatctta	8750
agactaacat	ttcttttctg	tattattaca	gatcgggtga	agacggagcc	8800
atttgaagaa	aattccttct	tggacaatt	tatggtagag	gtagagtata	8850
caacaataag	gattttcttt	ctccttgtgc	acttttgcct	tattttcttt	8900
ccaggtgccc	gagtagtgac	ttgtgttttg	ggtgctagct	ggtttgcatg	8950
ggtggagaat	ccttctctcg	caaaagtggc	ctatagaaaa	tctgttaaaa	9000
cttgagatgc	atgtggggaa	gatgggggtga	aatagggggc	aagactatga	9050
aaggcaaaa	tgggctgggtg	aacatttgta	aaaacatctg	tgctaacgta	9100
cctaggagtt	tcatttagaa	ttccctaacc	ttggagagtt	tggttgcccc	9150
gtcgatcaaa	tttttgcttg	ttgagatctg	atcacaggtc	tggattgtgg	9200
agcaggggtg	ggggaggagt	catcatgact	tgccccctca	acatcccaca	9250
gcagaggaag	gtgaaaagca	cagggttacc	atltgggaac	tgtcttgtgg	9300
gcacagtaat	ctgtggaaaa	tcacagtgtt	tatacaaggg	gactggcaaa	9350
ggaatgaatg	gggagttagat	aattgtggcc	tgtcagaagc	tcctgcctag	9400
gtttctcttc	taaggattga	gcttggccaa	aagaaacatc	tattaaacgg	9450
caaacagggg	agtattaata	atagtacact	ttgataatac	cagtcaatat	9500
tgtatttctc	ctctcactct	tttaggactt	gttgggtgta	cagttagtag	9550
cttcatctta	ttgcctctct	ttctaattat	acacattaac	caagctggta	9600
ctttactatg	taagcaaata	atgctattat	aatattgtgt	tctgtataga	9650
ttactcgtgt	ttctgtcttg	tcacttaggc	tactttgtaa	actcctgggtg	9700
gacagggact	atgactcata	tttcttttga	acatgaagtt	agtatttttc	9750
gcagggctag	gcagaaaagca	ggtgtttttg	acttggaacc	ttctgttctg	9800
cctctgtgca	gtggctgagc	aaagacgcca	tcgtgcttgg	ggtcttaaca	9850
gtgagaacca	aaaatgcaag	ttgagtgtc	aagcctatct	cctgaagcaa	9900
tctaactctg	gagaagaagg	aaagcatgca	ctgtgaagtc	ctgaggcaga	9950
gtagattttca	agtctttatg	gggaaagaga	gccccttaca	cctggacttg	10000
cacagagatt	tcctaggcca	tttttctgtc	ggagagcttc	ctccgtctct	10050
aagtgtaggt	tttaaggagg	ttaatgcagg	ctgaggatga	tatgctgatt	10100
ccctgtctct	gcccttagt	taaataatac	aagacttatt	ctcagcccag	10150
cagagaggtc	ccttctctgat	ctggtgcctg	cgtacctatc	cagctgggtt	10200
tcttgagatt	tttctttata	aaccttaggc	ttcagtcaga	gaatggcttt	10250
gaattgccaa	aatgccttcc	tctgccttt	atgtcttggc	acacattgtt	10300
tcctttatct	ataatgcccc	atgccctggc	cttatctacc	ttgtaaaactt	10350
ctattaatct	tttaagtgtc	agctttggct	tctttgagag	acctttccag	10400
actctccttg	taaagataat	ccttcttccc	tgctgctata	gtaccttgggt	10450
tcctacctcc	gttttatcac	atagaacttt	gtgatattac	tgtctatagg	10500
tcttcaagac	aatgcctttc	tcctctgttg	atctctgaaa	accatctgag	10550
ggcaaggact	gcgttgcatg	catttctata	tccccggggc	ctgaacatag	10600
tgctggggag	tagtagatcc	tctgtaagtt	tgtgggtgaa	gatgttacta	10650
atlttgtgct	agggggagtc	tcatgaaaat	tggggcagtg	tggcctgtgg	10700
atatgggtgc	gctgtgagac	ctaagtttgg	ggtcttcagt	tattctcctg	10750
ctttattttg	cagcttttgg	taaattagta	cttccagaga	ctctgttttc	10800
ttatttgcac	aattggaggc	tcacctcttc	catgcttttg	gggtaggggc	10850
aacctgacg	agtgcgaatga	gaaagcatag	aatcctggtg	ccagcccggg	10900
gaagagtatt	actgcattgg	aaccaattac	caattacttc	agaaatactg	10950
gtctcttaag	tcctgggtgg	atcacacca	aaccacatag	acgtacagaa	11000
ttttacatat	ctgcagagga	tctgagagac	aagtagctat	agctttccat	11050
ttcacagact	aagaaattgg	gcctcagaga	ggttaagtga	cttacctaa	11100
gtcatgtcgc	tgtagctgta	tgttttagagc	cttcctacat	ttcttgtctg	11150

```

ggatcatctc tattttggtt tgcactcta actggttgta cacaccaatt 11200
aaaggatggt taagggctag gatcatgggg aattattgtg acctctggga 11250
tactgcatc gtcctctggg atcaccaaat gttctgcata gctgctagaa 11300
cccatthttt aatgggactg cagaatthtt tatggccatt gcatctthtt 11350
agttactctg cttgtctggg gtctacaaa caggacacag aagggtcatg 11400
gggtcaccta aaacagctga aaggatgtgc catcaaaata agcaacatag 11450
gaagataaac aaaccagggg cagagagctc ggggtgaagg tgcagggggg 11500
ccagggctga tgtcagaggg ccacgcggtc agtgccctgg gtctgttttt 11550
cctggttcta ggcgagaggg tggagagata gggcacagag ggcagtagga 11600
caggagaggt tctaggatac taaggccagg aaaaatattt aagggttgaa 11650
cagaggttac atcttcatat ttagttcttt tgttttctct cccctacccc 11700
ccgctttgag ccttggtatt ctcatthtcca gggagcccaa gggggccagt 11750
tgatggtggc ccgactggag ggggagtgtc ggcagtgttc ttcaagtcca 11800
ctggacgggg tggcttcagg catgatttht atagagggaa gatctctgta 11850
gagagcatct cctaggactg ggagctggga ggcaccgtta ggagtaggag 11900
atgagtcaac gaatcagggg ccattactgc aaggcagtag gaaccgtgtg 11950
aaagaagttt aggaggatca ggctggcatg gccttctctc actctggtcc 12000
actggaggga gttccttctc ccggcccat ccctgcctcc tctctccat 12050
ctggttgcca tcaggctgtg tggctgctgg cgggctcttt atttatttat 12100
cccagtgtaa tgggggtgag agggagctgg cctgaggtct gattccgag 12150
gccatgccac tgagccacag gcggtttgca tgggtgtgtg agtactggg 12200
gctgatgtct gctcaacca gacgcggcca ggctcagggg cagcaggcag 12250
cccaaaatag agccccgccc tctgcagctg gcaacccttg gccaggaatc 12300
agcccttgac accaaaacct gagcaattgc atgaagtgg cttctttcag 12350
tgagggtggg ggtggggggg gcacttgaca gagagatcct ctcttccct 12400
gtcttcagag gagtgtattc agcacaatag tccttccac tgatgcatgc 12450
cttatacgat ttaaattaat ctgttcaatc caataccttc agcagtttct 12500
atcatatact tatatgacta tagtgacatt gatttgactc agcatcctaa 12550
atgtagccac agcctthtgt tcctgtctag ttttagtact gtcttcattc 12600
cctgtctggt tgcagcctgt tgctagagca gatgcttcaa gttgtgacga 12650
tattcattgc tgctcttaga aagctggaag ttatatcaaa gccgccctgg 12700
gaagaggagg aggagtcctt gaacctggaa attgcttgct gtccagttga 12750
gttcattcac ggacagcttc tgcttggttt ccttggtgg cgttccattc 12800
tttacctgct ccttaaattg tagtgttaat tcaaaattgt gtcccatcc 12850
acttgtcctt ctctctctgg gtcatctcat ccagacccca atttgaactg 12900
tcactattat accaccaagt gccaatthta tatctcccat catgcagccc 12950
atatttcttt tgcacattt gatgtttcta cctggatgag tccacattg 13000
tactacccta aacatgtcca aaataagcca cccactcccc ctctttctct 13050
tctgatattc ctaatcttgg agaatcctac ccgtatccat tcagctttct 13100
aagccagaaa cttgggagtt actcacttht ctctttgtcc ttactttcaa 13150
atcctacttg tcaactatct tttgaatctg ctctctctta atctggtgtc 13200
tgttgctta gaatagcagc accacccga ctacccccac aattgaattt 13250
gtattatgtc agagtgatct ctttgagaca gaaacagaaa tccagttgct 13300
taaagccatt tagtggttca aactccttgc atggcacaca ggtcgttca 13350
tgatttgggt ctcttgacct ctacagcttg atcctctgcc actttcccaa 13400
attgaagtcc tgatgcttat ttattccttg accagtgtgc ctgggattct 13450
cttctttctt gtctcacgg cagactcctg ttcagctttc ctgactgcac 13500
agacatcatc ccttttgtga gctttccatg accatttctc ctttctctgg 13550
tctgttttcc ttgccggcac aggtacactc tctgtgtgt cccgccgct 13600
cctgtactga ctgacctctc ccatagcatt tggaggacat ggaacgaaca 13650
ggatatggga atgaaaagga aggatgggga ggcaaggaaa attgagttgg 13700
ctgatctttt ctcatthtaga ttttctctt agaagacttg ttaattcctt 13750
ctctcaatg ttttcttgat atggcttcca tactgcaaca ctctcctgtt 13800
tttcttctta cttcatcggt tgctcctttt cagaatctcc tgctggttct 13850
ttctctccct tactcttttt ttttttttt ttaagatttt atttatttat 13900
tcatgagaga cacagagaga ggcagcgaca caggcagagg ggaagcatc 13950
tccatgcagg gagcccgatg tgggaccgga tccagctctc caggatcaca 14000
ccctgagcca aaggcaggca ctcaaccatt gagccacca ggtgtcccc 14050
tacttttttt taaagtaatc tgtaacctta acgcagggt gaactcaca 14100
cgtaaacacc ccaagatcaa gaatcgata ctctctgac tgagccagcc 14150
agggtgtgtt cccttacctc ttaatgttgg ggtgcctcag gattcaatca 14200

```

ttggtgctct	ttttaactt	tagtgatctc	atatagtccc	atggcttta	14250
ctaccacttt	attgacaaat	cccaaattta	atctctaccc	ttagacctta	14300
cctccaaact	ctagactgtc	tgcttgatat	tcccatgtgg	aagtccaaca	14350
gaatctgaaa	ctctacatgt	ccaaaactga	acttctaac	ttacccccag	14400
atgtgtttt	ctaacaacct	ccttccatct	tagctgatgg	aaatgtcacc	14450
ttttcatttg	ctagggccac	aaaccttaga	gtcatccttg	acttctgtct	14500
ttttctcata	tcccacatct	agtccatcag	gaagtccctg	tggccttcaa	14550
aacacaccca	taatttcacc	tttgctgctg	ccactctggt	ctgagccaca	14600
attgtctctt	tcttgcatca	ttgcaataac	ctctttattg	gtgtctctgc	14650
tgctacctat	gcccccttct	ggccattac	cagcaaagtg	atcttattaa	14700
aatacagatc	acatcatgat	actcccctgc	tcaaagtcct	tcattagttt	14750
acattacact	tctagagtaa	aacctaaagg	cctttacagt	ggcctacaaa	14800
gocctacgtg	atctggacct	cattaccttt	ctgatttcat	ctaccacttt	14850
ctccttctt	tactccattg	caccacact	ggccgcttgc	tgtttttcta	14900
gcactttcta	gcaccacttg	cctttagtcc	tttatgctgc	ccatttcctc	14950
tgcttggaa	gctctttctt	cagatatttg	tgtggccaag	tccttcactt	15000
cctttatgtc	tggattagtt	atctatcgct	ttataacaca	tcattccaaa	15050
atgtcatggt	ttaaaacaac	aaacagttgt	ggaaggtcag	gaatttggaa	15100
gcagcttagc	tgggtgattc	tgattcaggg	tctctcatga	agtcacagtc	15150
aagatgttgg	ctgggaatgt	gattattctg	aggcactgga	gaattcactt	15200
ccaagttctc	tcatgtggct	gttggcagga	gatgctgttg	ccctgtaaca	15250
tgacctctcc	atggggtttc	ttacatgaca	tggccctgcc	ttcctccaga	15300
gcaagtgatc	caaaagacag	gcgaagactg	aaatggaagc	tgcagccttt	15350
ttataaccta	atctcaggag	tgacagcaca	tcactctctt	gtggtgatct	15400
cttcattagt	agtgaagcag	taaatgtagg	ccacattcaa	ggggagggtta	15450
actaagctcc	acctcttaag	gggaggtgtg	tcaaaaatac	aatacatggt	15500
tttgttcaaa	tgttaccttc	acaatggagt	ttactgtgag	tatcctattt	15550
aaaatcataa	gccacatcct	cgcctctctg	cacatgactc	taattttgat	15600
tttttctata	gcattcatct	tccaacatac	tataaaattt	ccttatttca	15650
ttatgtctat	tgttcatggc	atcttcccc	tgttagagct	tgtaagctga	15700
gcaaggacaa	ggatggatgt	tttgtgccct	ggttcatcca	gagtacgtag	15750
aacactgcct	ctacacacag	taggcactca	gtacatattt	gttgaatgga	15800
tgaaggaaac	ttagcttccc	actcttcttt	atcttcccta	tcttatgaat	15850
aggccatgaa	atgatcaccc	tggttgtagt	ctgagacctt	gatagcccta	15900
ctataaatag	atgagtaacc	taaggagaga	attgctgtca	gattgccatt	15950
cattctccca	cctgcctggt	tactgggata	taatcccaat	tttgggatga	16000
actataaacc	tgaatcttt	tattactgaa	atccccataa	acctctcttt	16050
tagaccagct	tcagaaagca	actatctggg	atccctgggt	ggcgagcg	16100
tttggcgctt	gcctttggcc	cagggcgcca	tcctggagac	ccgggatcga	16150
atcccatatc	gggctccga	tgcatggagc	ctgcttctcc	ctctgcctgt	16200
gtctctgcct	ctctctctct	ctctgtgact	atcataagta	aataaataaa	16250
aattaaaaaa	aaaaaaaaaa	aaagaaagca	actatctcag	aaacaaaaag	16300
aataagaacc	taccagggca	cctgggtggc	tcagtcggtt	aagtgtctgc	16350
ctttggctca	ggcatgatc	tcagggtcct	gggattgagc	cccacatcag	16400
gtccctgtct	caacggggag	tctgcttctc	tctctccctc	tgccccctcc	16450
ccccgtgctt	gtgcgggtgc	tcttcttttc	tctctgtctc	tctctcaaat	16500
gaataaataa	aatcttaaaa	aaagaaaaag	aacctaccaa	aatcctggaa	16550
agaacattag	tcatacagcc	aaaagcaagt	taattagttt	cctctttcct	16600
cagtttttcc	tctccctgag	ctgccctgcc	accataagcc	cgttattcaa	16650
tatgtagagg	aagacacagg	actcagcata	ggtattttca	gtatccccat	16700
gggcatcatg	aagcaggata	aatctagggg	catgagactg	tcctccgtac	16750
catcgtgtgt	gtcagtactc	tgatctagag	aaacttacag	ttaattcatt	16800
cttccggtag	tcagcttggt	gcatgttctt	gtggggcata	cgggggatga	16850
taatattatc	atcaaagagc	tcgctgtgct	taatgaatga	taataggggc	16900
tacaatagt	tagtgattgg	aaaaagcttc	ctgcaaaagg	caggacttga	16950
tctggacttc	tgtgtttgtt	tgggtttttg	ctagggaaact	aggtggaagg	17000
catttttagct	gggaagcaca	tgggcaaagg	atgtaaagtc	ataatgagtg	17050
ggtgaggatt	agcagaaaat	aaggtttagca	agatgataac	tcgaggccag	17100
gttgttgggg	agccttaaat	gctgggctgg	atgattggta	ctttattctg	17150
aaggtaaatg	tatttcagct	tttttttttt	ctgccagtaa	tccatttatt	17200
tgctgttttc	aatccagtta	ttaacatcta	tcattacacg	cagtgtattct	17250

```

caaacaggca catttcccta ggaaggagat gggcacttcc ttctcgcagt 17300
tattaattac tgttatagat agtgggaagc cgtggaaagt tttggctgga 17350
gaactgacat atgaaagcga tctttggcaa gattaggctg tcagtgggat 17400
gcctatgtga gctgaagaat agtgggtgcta ttgacagact aggaaaaatca 17450
tgggtggggc tcaattaaat ctaatcttgg gtatacaaag gaatggtttt 17500
ccttatttaa aacacaaatc caccagtatt tgagctctgg aatgaaaatc 17550
tccagggagg aagggatggc tgcataatgt tctcagctat atttctcggg 17600
aattttgcc cctccttggg gttttctcaa tgtggttcct gtagtcacca 17650
ttgagccctg ctaccagggg tcaccacctc ttttcttttt ggccccagaa 17700
tatattaaaa ggcttctttc tttatattcc ttttataaaa cgttataggg 17750
gcttatgctt tcaaaaagaa atttataaaa aatctgaggg caaacaaaaa 17800
ggaaatcagg atgaaaattc aaatgggata aaattactga tatccaagag 17850
atggatttct gatgctggga atccttaata gtggagatct tcattaactt 17900
ctgaattctc gtatcctaaa agcctcaaaa tcaagtgtt actaactcaa 17950
atgtctaaag gggacagaca tacaatataa atatgatatc ttatatcagg 18000
ctggatataa tacaacatgt ttttgggggt ctgtggaaaa ctgaatcgca 18050
catgcccccc tctatctaga cccaaatagg ttagcacagt tgaacagaca 18100
ctgttctggg ggcttgtgta gtttacttca ctgaaaggaa gtaccagctc 18150
cttctaaaaat                                     18160

```

<210> 2

<211> 21

5 <212> ADN

<213> secuencia artificial

<220>

<223> cebador CEAF21a

10

<400> 2

ggaggagtca tcatgacttg c 21

<210> 3

15 <211> 21

<212> ADN

<213> complemento inverso del cebador CEAF21a

<400> 3

20 gcaagtcatg atgactcctc c 21

<210> 4

<211> 22

<212> ADN

25 <213> secuencia artificial

	<220>		
	<223>	cebador CEAR17d	
5	<400>	4	
		gactggtatt atcaaaggtc ac	22
	<210>	5	
	<211>	22	
10	<212>	ADN	
	<213>	secuencia artificial	
	<220>		
	<223>	complemento inverso del cebador CEAR17d	
15			
	<400>	5	
		gtgacctttg ataataccag tc	22
	<210>	6	
20	<211>	20	
	<212>	ADN	
	<213>	secuencia artificial	
	<220>		
25	<223>	cebador CEAF22a	
	<400>	6	
		tgtcctccgt accatcgtgt	20
30	<210>	7	
	<211>	20	
	<212>	ADN	
	<213>	secuencia artificial	
35	<220>		

	<223>	complemento inverso del cebador CEA22a	
	<400>	7	
		acacgatggt acggaggaca	20
5			
	<210>	8	
	<211>	23	
	<212>	ADN	
	<213>	secuencia artificial	
10			
	<220>		
	<223>	cebador CEA22c	
	<400>	8	
15		ctagtctgtc aatagcacca cta	23
	<210>	9	
	<211>	23	
	<212>	ADN	
20	<213>	secuencia artificial	
	<220>		
	<223>	complemento inverso del cebador CEA22c	
25	<400>	9	
		tagtggtgct attgacagac tag	23
	<210>	10	
	<211>	283	
30	<212>	ADN	
	<213>	secuencia artificial	
	<220>		
	<223>	producto de amplificación por PCR	
35			

<400> 10

```

gactgggtatt atcaaaggtc actattatta atactccctt gtttgccgtt 50
taatagatgt ttcttttggc caagctcaat ccttagaaga gaaacctagg 100

caggagcttc tgacaggcca caattatcta ctccccattc attcctttgc 150
cagtcccctt gtataaacac tgtgattttc cacagattac tgtgcccaca 200
agacagttcc caaatggtaa ccctgtgctt ttcaccttcc tctgctgtgg 250
gatgttggag gggcaagtca tgatgactcc tcc 283

```

5 <210> 11

<211> 283

<212> ADN

<213> secuencia artificial

10 <220>

<223> producto de amplificación por PCR

<400> 11

```

ggaggagtca tcatgacttg cccctccaac atcccacagc agaggaaggt 50
gaaaagcaca gggttaccat ttgggaactg tcttgtgggc acagtaatct 100
gtggaaaatc acagtgttta tacaagggga ctggcaaagg aatgaatggg 150
gagtagataa ttgtggcctg tcagaagctc ctgcctaggt ttctcttcta 200
aggattgagc ttggccaaaa gaaacatcta ttaaacggca aacaggggag 250
tattaataat agtgaccttt gataatacca gtc 283

```

15

<210> 12

<211> 702

<212> ADN

<213> secuencia artificial

20

<220>

<223> producto de amplificación por PCR

<400> 12

```

ctagtctgtc aatagcacca ctattcttca gctcacatag gcataccact 50
gacagcctaa tcttgccaaa gatcgcttcc atatgtcagt tctccagcca 100
aaactttcca cggcttccca ctatctataa cagtaattaa taactgcgag 150
aagggaagtgc ccatctcctt cctaggaaat gtgcctgttt gagaatcact 200
gcgtgtaatg atagatgtta ataactggat tgaaacaggc aaataaatgg 250
attactggca gaaaaaaaaa aagctgaaat acatttacct tcagaataaa 300
gtaccaatca tccagcccag catttaaggc tccccaacaa cctggcctcg 350
agttatcatc ttgctaacct tattttctgc taatcctcac ccactcatta 400
tgactttaca tcctttgccc atgtgcttcc cagctaaaat gccttcacc 450
tagttcccta gcaaaacccc aaacaaacac agaagtccag atcaagtcct 500
gccttttgca ggaagctttt tccaatcact acactattgt agcccctatt 550
atcattcatt aagcacagcg agctctttga tgataatatt atcatcccc 600
gtatgccac aagaacatgc accatgctga ctaccggaag aatgaattaa 650
ctgtaagttt ctctagatca gagtactgac acacacgatg gtacggagga 700
ca 702

```

<210> 13

<211> 702

5 <212> ADN

<213> secuencia artificial

<220>

<223> producto de amplificación por PCR

10

<400> 13

```

tgctctccgt accatcgtgt gtgtcagtac tctgatctag agaaacttac 50
agttaattca ttcttccggt agtcagcatg gtgcatgttc ttgtgggcat 100
acgggggatg ataataattat catcaaagag ctcgctgtgc ttaatgaatg 150
ataatagggg ctacaatagt gtagtgattg gaaaaagctt cctgcaaaag 200
gcaggacttg atctggactt ctgtgtttgt ttgggggttt gctaggggaaac 250
taggtggaag gcatttttagc tgggaagcac atgggcaaag gatgtaaagt 300
cataatgagt gggtgaggat tagcagaaaa taaggtttagc aagatgataa 350
ctcgaggcca ggttggttggg gagccttaaa tgctgggctg gatgattggt 400
actttattct gaaggtaaat gtatttcagc tttttttttt tctgccagta 450
atccatttat ttgcctgttt caatccagtt attaacatct atcattacac 500
gcagtgattc tcaaacaggc acatttccta ggaaggagat gggcacttcc 550
ttctcgcagt tattaattac tgttatagat agtgggaagc cgtggaaagt 600
tttggtgga gaactgacat atgaaagcga tctttggcaa gattaggctg 650
tcagtgggat gcctatgtga gctgaagaat agtgggtgcta ttgacagact 700
ag 702

```

15 <210> 14

<211> 430

<212> ADN

<213> secuencia artificial

20 <220>

<223> producto de amplificación por PCR

<400> 14

ggaggagtca	tcatgacttg	cccctccaac	atcccacagc	agaggaaggt	50
gaaaagcaca	gggttaccat	ttgggaactg	tcttgtgggt	tggtggggag	100
ccttaaatgc	tggtctggat	gattggtact	ttattctgaa	ggtaaatgta	150
tttcagcttt	ttttttttct	gccagtaatc	catttatttg	cctgtttcaa	200
tccagttatt	aacatctatc	attacacgca	gtgattctca	aacaggcaca	250
tttccctagg	aaggagatgg	gcacttcctt	ctcgcagtta	ttaattactg	300
ttatagatag	tgggaagccg	tggaaagttt	tggctggaga	actgacatat	350
gaaagcgatc	tttggcaaga	ttaggctgtc	agtggatatgc	ctatgtgagc	400
tgaagaatag	tggtgctatt	gacagactag			430

REIVINDICACIONES

1. Método para identificar un perro como normal, o heterocigoto para, u homocigoto para la mutación de la anomalía del ojo del Collie (CEA) que comprende la etapa de:
 - 5 a) someter a prueba la muestra biológica que comprende ADN obtenido del perro para detectar una mutación en una región del cromosoma 37, en el que la mutación es una delección de los nucleótidos correspondientes a de la posición 9.302 a la posición 17.101 de la SEQ ID NO:1,

en el que la identificación de la delección en sólo un alelo es indicativa de un perro que es heterocigoto para la mutación de CEA, la identificación de la delección en ambos alelos es indicativa de un perro que es homocigoto para la mutación de CEA y la ausencia de la delección en ambos alelos es indicativa de un perro normal.
- 10 2. Método según la reivindicación 1, en el que la presencia o ausencia de la delección se somete a prueba mediante amplificación del ADN seguido por el análisis de los productos de amplificación.
3. Método según la reivindicación 2, en el que la amplificación se lleva a cabo usando un conjunto de cuatro cebadores,
 - 15 en el que, en ausencia de la delección, la amplificación usando los cebadores primero y segundo produce un primer producto de amplificación que abarca el punto de rotura inicial de la delección, la amplificación usando los cebadores tercero y cuarto produce un segundo producto de amplificación que abarca el punto de rotura final de la delección, y la amplificación usando el primer y el cuarto cebador no produce ningún producto de amplificación detectable; y
 - 20 en el que, en presencia de la delección, la amplificación usando el primer y el cuarto cebador produce un tercer producto de amplificación que no contiene la región delecionada.
4. Método según la reivindicación 3, en el que los productos de amplificación primero, segundo y tercero son de diferentes tamaños.
5. Método según la reivindicación 2, en el que el primer cebador corresponde a una secuencia en el sentido de 5' del punto de rotura inicial de la delección, el cuarto cebador corresponde a una secuencia en el sentido de 3' del punto de rotura final de la delección y los cebadores segundo y tercero corresponden a secuencias dentro de la región delecionada.
- 25 6. Método según la reivindicación 3, en el que la amplificación usando los cebadores primero y segundo, la amplificación usando los cebadores tercero y cuarto, y la amplificación usando los cebadores primero y cuarto se realizan cada una en reacciones separadas.
- 30 7. Método según la reivindicación 3, en el que la amplificación usando los cebadores primero y segundo, la amplificación usando los cebadores tercero y cuarto, y la amplificación usando los cebadores primero y cuarto se realizan en la misma reacción.
8. Método según la reivindicación 3, en el que el primer cebador tiene la secuencia de SEQ ID NO:2, el segundo cebador tiene la secuencia de SEQ ID NO:4, el tercer cebador tiene la secuencia de SEQ ID NO:6, y el cuarto cebador tiene la secuencia de SEQ ID NO:8.
- 35 9. Método según la reivindicación 3, en el que el primer producto de amplificación comprende la secuencia de SEQ ID NO:10.
10. Método según la reivindicación 3, en el que el segundo producto de amplificación comprende la secuencia de SEQ ID NO:12.
- 40 11. Método según la reivindicación 3, en el que el tercer producto de amplificación comprende la secuencia de SEQ ID NO:14.
12. Método según la reivindicación 1, en el que la muestra biológica se selecciona del grupo que consiste en sangre, pelo, raspados de mucosa, semen, biopsia de tejido y saliva.
13. Método según la reivindicación 12, en el que la muestra biológica es sangre.
- 45 14. Método según la reivindicación 1, en el que el perro se selecciona del grupo que consiste en Rough y Smooth Collie, Border Collie, pastores australianos, Lancashire Heeler, y perro pastor de Shetland.
15. Kit para identificar un perro como normal, heterocigoto para, u homocigoto para una mutación de la anomalía del ojo de Collie en una región del cromosoma 37, en el que la mutación es una delección de los nucleótidos correspondientes a de la posición 9.302 a la posición 17.101 de la SEQ ID NO:1, que comprende:

- 5 un conjunto de cebadores que comprende un primer cebador, un segundo cebador, un tercer cebador y un cuarto cebador, en el que el primer cebador corresponde a una secuencia en el sentido de 5' de la posición 9.301 de la SEQ ID NO:1, el cuarto cebador corresponde a una secuencia en el sentido de 3' de la posición 17.102 de la SEQ ID NO:1 y los cebadores segundo y tercero corresponden a una secuencia entre los nucleótidos 9.302 y 17.101 de la SEQ ID NO:1, en el que la amplificación de un alelo normal con los cebadores primero y segundo produce un primer producto de amplificación que abarca el punto de rotura inicial de la delección, la amplificación de un alelo normal usando los cebadores tercero y cuarto produce un segundo producto de amplificación que abarca el punto de rotura final de la delección, y la amplificación usando el primer y cuarto cebador produce un tercer producto de amplificación sólo para un alelo que tiene la delección.
- 10 16. Kit según la reivindicación 15, en el que el primer cebador tiene la secuencia de SEQ ID NO:2, el segundo cebador tiene la secuencia de SEQ ID NO:4, el tercer cebador tiene la secuencia de SEQ ID NO:6 y el cuarto cebador tiene la secuencia de SEQ ID NO:8.

1/1

```

1 GTGTATTAC ATCAACCAGC TTGTGGGCTT GTAGGTGGCC AAGGGAGGTC AGATCAGGTT
61 GAGACAATTC CAGCGAATGG CCTGCCCTTC CACCTAAAGC CCTGGGATCT TTCCATATTT
121 CTGTCCCTGT TTGTTTTTTG CGTGCCCCAC AGTACAAGGT AGGATTGTGA AGTAGGCCAG
181 TTGCTCTCTC TGTGTTCTTC TTTCCTCTTC CTGTTTATTT TTCTTAAAGA TTTTATTTAT
241 TTATTTATGA GAGGCACAGA GAGAGGCAGA GACATAGGCA GAGGAACAAG CAGGCTCCCC
301 ATAGGGAGGG ACTCGATCCC AGGACCCCGG GATCACCACC TGAGCTGAAG GCAGATGCTC
361 AACCCTGAG CCACCTGGGT GCGCCCTCTT CCGCCTTTT TGTCTTCTCT TCATCTCCAC
421 TGCGCTGTCT TCATGTTAGC CAGAGTTTTT CTTTACTGTT GAGGGGAGTC TGTTCCTTG
481 TTACACCCCG ACTCCATACA ACTCCTGCTG TCTTTTATAG AGCTGAACAA GCGCCTGACA
541 GCTCCACCTG CCGCTTTTCT CTGTCAATTT GATGATCTGC TTCGCCCACT GTTGAAGGAC
601 ACTACTTTCC CCAGCGAAGC TATGTTTACC TGTGATCATG TGGCCGAGGC ACTGATACTA
661 CGGGTGCGGA GTGAACCTCT TGGTCTCCCC TTTTATTGGA ATTTCCACTG CATTCTCTGCT
721 AGCCCTTCCC TGGTGAGTGT AATTCAAGTG TGGAGTGGGG AAGGGGAATG CCAGCTGCTT
781 CAAGATGAAT CTTTAGGTGT TCTTATTTTT GTGTGGATTC CACTTGAAT TCTTCTTCAG
841 TCAGAACACT TTCCTTGATT AGACAGAAGG CAAAACAGAT TCTCGACTGG TACATCTTTT
901 CCTTGCAAG GGAGCAGGGT TTGGGTTTAC CTGCTTTATT GAGCGTCTTT AATATTCAAC
961 ATTTATTAA GATCACTTTA GGCTGGTGT TAGGTGTCCA GATCTAAAAC AAATAGCCTA
1021 TTCCTGGAGT TTATAATCTA GTGAGAAGAT AGACAGGAAG CAGAAATAAG TATGGTAAAT
1081 TCTTTGGTTG AAGTAAGCTC AGGATGAGTG AAAGTTTGAA AAACCTTTTT TTGAAGAGAG
1141 TTTTTTTTTT CTTTTAGAAA GTGGAGGGGG AGGGGAAGAG GGAGAGAGAG AGAGAGAGAG
1201 AGAAAGAGAG AGAGAGAATC CCAAGCAGGC ACCATGCCCC ACAGGGAGCC CAACATGGGG
1261 CTCATCTTA CAACCTGAG ATCATGACCT GGGCCGAAAT CAAGAOTTGG GTGTTTCACC
1321 GACTGGGCCA CTGAGGCACC CCATTGAAGA GATAGTTTCT AAGTTGTGTT TTGGAGATGA
1381 GGAGGGGATA ACCGGGAGAA GATCAGGTCA GTCTAGGCTG GAGTGCATT TTGAGGCGAG
1441 GGAGATGTAT AGGTATGGGG CAAGGGAGGG AATTTTATGA CTGCAGGAAG TTGTGGGAAA
1501 TGAGGTGGGC ATTTTGAAGA ATTCTAATGA GTTTGGATT TATCCTTAAG GCAACAGAGA
1561 TCATTGAAA AAGTTTATTT TATTATTAGA AAATATTAA TTTATTTATT TGAGAGAGTA
1621 AGAGCCAGAG AGATCAGAAG GAGAGGGACA GGGAAAAGCA GGCTTGCTGC TGAACAGAGA
1681 TCCAGTGTG GGGCTTGATC TCAGGACCTT GAGTCAATGAC CTGAGCTGAA GGCAGACGCT
1741 TAACCGACTG AGCCACCCAG GTGCTGTCAT TGAAAACTT TAAGCAGGGG TTTAACATGA
1801 TCCAGTTTCA ATCAGTCTGG CAAGGATAG AGTACGTGCC AGTGTAGCT ACCTTTCTGA
1861 ACATTTGTCA TTGGATCCTC ATGACTATCC TGCAAGATAA GTAGTATTTA TTCCTTGTTT
1921 TCAGAGTAGG AAGCCAAAGT TGAAGGCAAT GTGTCCAAAG TCATCTAATC TGTAAAGTAA
1981 TGAGCTGGAA TTTTACTCCC AGGGAGGTCT GATTGAGAG CATTATTTCA AGGACTAGGA
2041 TGATAATGTC TTCTGCTTAC ACAGCTTTCT AGGCTTCCAG AGCTTTTATT TTTTATTTTT
2101 TTAAGATTTT ATTTATTTAG TTATGATAGA CACACACACA CACACACACA CACACACACA
2161 CACACACACA CACAGAAGCA GAGACACAGG CAGAGGGAGA AGCAGGCTCC ATGCTGAAAG
2221 CCGATGTGG GACTCGATCC CAGGACTCCA GGATCGTGCC CCGGGCCAAA GACAGGCGCC
2281 AAACCGCTGA GCCACCCAGG GATCCCTCCC AGAGCTTTTA TTAGAAATTA GTTTGACATG
2341 GGAGACACCT AACTCTGGGA AAGGGGTAGT GGAAGGGGAG GTGGGTGGGG GGTGGGGTGG
2401 ACTGGGTGAC GGGCACTGAG GAGGGCACTT GGCAGGATGA GCCTGGGTG TTATGCTAAA
2461 TGTGACAAG TTGAACCTCA ATAAAAAATA TTAATAAATA TTAGTTTGAG AGAGACGCTG
2521 GGGTGACTCA GTGGTTGAGC ATCTCCCTTC AGCTCAGGTC ATGATCCTGG GGTCTCTGGG
2581 TCGAGTCCCA CATTGGCTTC CCCACAGGGA GCCTGTTTCT CCCTCTGCCT GTGCTCTGCT
2641 CTTTCTCTGT GTCTCTCATA AATAAATGAG TAAATCTTT AAAAAATAA ATTAGTTTGA
2701 GAGTAAACAG TAAGAACTTG TTTGCAAGAA TTAAGTCCAC TGGTCCCTTC CACCCCTTTA
2761 TATAACAGA GCTGTTTCAG TCAGTAGCAT TAGAGGCCAA GGTCTTCTAT GGGAGGCCTA
2821 AGGGTGTAGG TTTATCAGCA GAAGCACTTG AAGACAAGTG GGCATCTTTT CCTATATCCT
2881 TTCTTTAGTT TTCTGAGGT CATGTGATCT TTTGGCACC ACGGAGTGGG TGGGACCAAG
2941 TATTTTGGAG AAAGTGTCT TTGGTGGATT TCTTTCTTCA AGATTTATTT ATTTATTTGA
3001 GAGAGAGAGA GTGTGTGTGT GTGTGTGTGT GAGGGACAGG GCGAGGGAGA GAGAGTCTCA
3061 AGCGACTCCA CGTTGAGCAC CGAGCCCAAT GCGGGGCTTG ATGCCATGAC CCTTAAGTGA
3121 AACCAGAGT CAGAGGCTCA ACTGACTGTA CCACCCAGGT GCGGCTCTGG TGGAGTTTGG
3181 ATTTGGAATC CAGTAAAGGT GGACTTGAGT GCTTGAGAA CTCTCTATTC ATCTCTGAAT
3241 TTCTGAGGTC CATCAACAGT GTTTAGCAGA TAATAGTTTT GATCTGTTGA TTTTCTGAAA
3301 ATTTTGTGTT GCAATTTTCC ATCCTTTAGA TAGTTTACCT CTGTTTCAAA TCCCTGTAAT
3361 TTTTTTCTAA GTAAACACAG GGGGCACTGT TCCCTCAATA ATGCTTGTTC TGAACCAAAA

```

Figura 1A

2/11

3421 AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA TGTTCGGGA GCCCTTGGGA AGTCCTAGCA ~~XXXXXXXXXX~~
 3481 TCATTGTGCA TCACACAGCC CTCGAAATTC AGAATAGTGA GATTGAGAAG GTAGTCTCTAG
 3541 GAGGGTGATG GGCTCTGATA GTTTTTCCTC CCCCAATTA AAAGGAAACT TGTATAATGA
 3601 TATTATACTA GAAATAATA TGTAAAGGGA AAACGAGCTA TTCTAGGCAA ATTCCTCTAA
 3661 TTGGGCAGCC CCAATAAGAA AAGAAGCTTC AGTATTGGGG AGACCATTGA ACAATTGGTG
 3721 AACAAATTAGG CTTTAAGGTA AAATAAAATA TGTATTATTA TAAAAAGAA GACTACCAGC
 3781 CCAGGGAAAC CCCTGAGCCT GAGGAAGCTT TATAGGGAAA AAGTTAGAGC CAGCGGACAC
 3841 TGTCAAGGAT GTAGGCGGAT ACTATTCCAG GCTTGTGTGT GTGTCTGTGA GGTACACAG
 3901 TCATAATTTT TGTTTATTAC TCATTCTTGT GATAGTTTTT ATTTCATTTT TTTTCAATGA
 3961 GTAAATCATG CAAAAGGCAA ACATTTCAA TAGCATTAG AAAGGGTCTA GAGTGAAAAA
 4021 ATAGGTCCTT CTACTCCACC CTCTAGTCTG TTATTTTCCT TCTTTAAAGC AACTACTGAT
 4081 ACCATCTTCT TGTGACTTCT TAAGGAAAGC TATACGTAGG TTTGTGTAGA TGTAAGTATG
 4141 TGTGTACTCA CACAATCAAA TACTTATCTG GCGTATGGA TGCCTTTTCA CAARTGGCAG
 4201 CATACTATCC ACACTATTCA GTAGCTTGCT CTTTCACTT AATTATAGAA CTTAGAAAAAT
 4261 ATTTGTAACA ATCTGCTTGG ACAATCTGCT TTAATATTCT TTAATGGTAA CATAGAGTTT
 4321 TATTGTATGG CATATATCAA CTGTATTGGA ATCGATACAC TACTAGTAGA TACTTAAGTT
 4381 GTTTCATTTC TTTTGTGTGT ACACATAGTG GCTACTCTTG TATTTACTTT TCCTACGTGT
 4441 AAATGTAAAG GTAACTTTCT AGCAATGGAA TAGTTGAATC AAGGAGTATT TGGGGGCTCC
 4501 TGGATGGCTC GGTGGAAGG GCGTGCAACT CTGATCTCA GGGTCGTGAG TCTGAGCCCC
 4561 ACATCAGGTG TAGAGATTGC TCAAAAAAAT AAATAAACAA ATGTAAAAAA AAGGAGTATT
 4621 TGTATCATT AATTGTCTCA CAATAATGCC AGATTGTCTC TCAGAGAGCT TGCACACCTA
 4681 AACTCCTACT AGCCATGCAG GAGAGTAAGA GAATACAGCG TGTGGTGTGT TCACGCCAAG
 4741 ATCTCAAGGC TGTGCAGGAT ATCATGAAAT ATCTCAAGCC TCAGATTTCCT GCTTCTAGC
 4801 CCATTTCCAC TTCCAGCCAG CTTCCTTCAT TCCTCTTCC TCCTCAAAAA TGAAGGAGTC
 4861 CAAGTATGTG CTCGCAATGA CTTATCCAAG GTAATAGAAA TCGAGTGGTG GAGCTGAGTT
 4921 ACAAAAGCAT GTGTGTTCTT CTGCCCACAC AAAAACCCTG TTGTATTACC TTGGATAAGT
 4981 CATTGAATTT TTATGAGACT TGGCTTCATC ATTGATAAAG AGGAGGCACC AGTCCCAACC
 5041 TTAATATGGA ATCTTGGGGA CTAAATACGA GAACATACAT AGTAGTACTT AGCTTCAGCA
 5101 TTAATGTGGA CCTTTGAGAA CACATACTCG GACTCCCTAA TTTTCTCTTG AAGAAAATAA
 5161 GGGCCGTGAG AGTGCTTGGG ATTAAGCCAT TTTCACATCT AGATGCTCTC AGAGCCAGGG
 5221 CTAGAAATCCA GATGGAATTT CCAGTCTGTT GCTCTGTGCA CCATATCCAA ACCTGATAGG
 5281 ATTCATTTTG OGATTGATAA CTGCCATTCA GCTCTCTGTC CTCTGACTGT CAACATTTCA
 5341 ATGGGAAATC TGCAGATGTC AGGGGTGGGG GTGGGGGTGG GAGGGTGTGA TAAATAGATT
 5401 TCCTCTGGA AAGATTGACA ACTCCTGCTT CTGTATCTAC CACACTTCCT GACCTCCTTA
 5461 ACTCTCCTGA GAAATTTGAG AGCAGAAGCC TCATGGGTTT ACAGCATGTA CTAGGCACAT
 5521 AGTAGGTGTC TGTGAAATG GCTTGTGGAA TCGCACCTCT TCATATATCA TCGTCTGCAA
 5581 ACGAAGGGGT GGGGGTCTTC CTGACCTGAA GTGCTTCAAG ATTTTCTCTT GAAATCCTT
 5641 GAAATATCTG TGGATTGCT TTGAAATCTA TTAATTCAGC CACATGACTT GTCCTAATTA
 5701 ATTGTCTTAA GCATGCATCT AACTTGGAAA TGAGTTATAC CCCAATGATT CAGAGTGGTG
 5761 TAGTCCAATT CTATGAAATT ATTTGAAAAG TTGAGATATT TACTGAGAAA AAGCTAAATT
 5821 ATTTTCTCTT TGTGTCTATA TAGACATTGG CGTCTGGTAC ATAGCTTCGG GTGCTGGCA
 5881 TGGCATTACT TTATTATTAT ATTTATTTAT TTATTATTAT ATTTATTTAT TATTATTTT
 5941 AATGATAGTC ATCAGAGAGA GAGAGAGAGA GAGAGAGAGG CAGAGACACA GGCAGAGGGA
 6001 GAAGCAGGCT CCAATGCACG GGGAGCCCGA CGTGGGACTC GACCCCGGGT CTCAGGATC
 6061 GCGCCCTGGG CCAAGGCCAG GCGTTAAACC TCTGCCAC CCAGGGATCC CTACCCTATA
 6121 TATTAGATA CAGCATTGAT TAAAGCTGT TTCTCTTAT GTTCTCTGTT TATTTACCAC
 6181 CACTCAAAGA GATGCTGTT AAGGTGGATT CCCAGAGAGA GGCTGGTGT CACCTTTAGG
 6241 AGTTTCTGTT ATTTGAGGCT TGCCGCCAGA GGGATGGTGA TGCTGCTTGG TTACCAATTG
 6301 CAATTACTTT CAGTTCAAGC CCTCTAAACA CGGACTTGCT TTCATACAG GATTACCTTA
 6361 TTTTCCACT ATTACCTCG AACAGGACAA AACCTAACAA AATAGTTCTT AGGAAAGAAAG
 6421 GTTGGGTCTG GAGCAGATGA ATTTCCCCAA AGCAGAACTT CTGCTGCATT TTGAACAGTA
 6481 TTTGGAGGCT TCAGTTTATC CTTAGGACCT GAAGTGGGAA CCAGGACCAG GTTGGGATGT
 6541 GCTGCATGAT GGAAGAAGT GACTGGTGT TCCAGCTCCA TTTGACTTCT GGCTTCTGTC
 6601 TCTGCATCAG CCCCCCTGCA TTTATTGGGT CCGGTGGTG GTACAAAAGC TGCTGCCCTCT
 6661 CGCCCGTATC CCCCTCACCC CAATCTCTTC TCTCTGATC TGTCTTTAGA GAAGCGTAGG
 6721 GGTGCTTATA ATATGGCCAG TTGGCCAACT CTGGCTTGCT GCCTATTTT CTGAAGTTAT
 6781 GTTGGAAACC CACTACCCTC ATTTATTACA TGTGTCTAT GGCCATTTTC ATGAAGTAAC

Figura 1B

3/11

6841 AGCAGAGTTG AGTATTGTGA CAGGGGCTGT ATTGGCTGTA GAGCTGAAAA TATTGACTAT
 6901 CTGACCCATG CAGAAAATGT TGCTGACCTC TGATCTCGGG CCTTTCCTTT TAATGTTTCC
 6961 TTTAGCTCAT CTCCTTGGGG AATGTGAAGG AAACCTTGAT AGCATCCTTT GGTCACAAAG
 7021 AAATTATTGA TTTTATTAT TATTTTATTT TTAAGAGATT GTATTTATTT ATTTATTTAT
 7081 TTATTATTTT ATTTATTTAT TTATTTGACA CAGAGAGAGA GTACATGCAC AAGTAGGCAG
 7141 AGCGCAAGC AGAGGAGAGA GGGAGAAGCA GGCTCCCTGC TGAGTAGAGA GCCCAGTACG
 7201 GGATCATGAC TCTCTGAGCC AAAGGCCAAG ACAGACTCTT AACTGACTGA GCCACACAGG
 7261 TGCTCCGAGA TGATTGATTA TAGTTATTTT CTTTGGCTAA GGCCTCTTTT TTTCTAAGAC
 7321 TACTGGATAC CTTGTGTAGG TGAATTAGGT AATTATTCTA TATAGGTATA TGTGTGTATA
 7381 TGAGAACAGC ATCCTAGTTG CACAGCAGCA TGGCTATGCT TATGTCTTTC TTACCTTGTT
 7441 AAGAGCAAGG TGTGCTGGGC CAGTTTCATC CTTCTAGGC TGACCTCTTG GTGACTGGCT
 7501 GGCTTCTGTT CCGATGACCT TAGACTTTGC TGCAATTGTG GGAGCAGATC GAAACTCTCA
 7561 TTCTGGACTA TCATCAGCCC TGAATGGCT TGTAAAGCAGT GGCTGGGTCT AATTCCAAAG
 7621 GCTTCTGCT CTTCTGTGAC TTTTGTCTTC TGTATGTGC CAGCTAGCAC ACTCTTTTAA
 7681 CTACACCTAC TTTCTGAAG CCTACTTGA TTTTCTGCTT TTGTAGTCT CTGCAGGAGA
 7741 GTTGAACAA CACCTTCTC TTATCAACTC TGTTACAACC TTCTCTTAA ATCACCCTC
 7801 TGGGCTGTCT ATCCATGTGT TCTCTCTCT TCTTCCACC CTTTATCTA TGCTACAAAG
 7861 AAAGCCCTCG AACTTCTTTC ACATACCTAT TTAGTTACTG TATTTTATA GCCATGTAAA
 7921 TGGATTGCTT GCTTATGAAA CTGTAAGTCC CTGTGAAAAC ATATATTTT CAGTATTTT
 7981 CTAGTTCCCTA ATATAGTGT CCGGAGTACT CTGTAAGTGT CTGTTGGCTG ATTGATATCT
 8041 CTTCCATGAA AGGTCTCCCA GCATTGTGTT CGTCTCTCA TGGGCATGAG TCTGGCTTG
 8101 CAGTGCCAAG TGAGGGAAC AGCAACCTTG CTTCCCATGA AAGATCTAGA GATCCAGGAC
 8161 TACCAGGAGA GTGGGCTGT GCTGAGTCCA GGTGAGAGGG CATTCTTTGG GGTGTGTGG
 8221 TGGGACTGG TACAGGTGGC CAAAGGGCCT CAGAAAATGG GAGAGTCAAT TGCATTAGAG
 8281 GTGTGCTTCC CTGAGGAGGT GCTGGGTACT GACCATAACT GGAGACTTGA GCTGGGTGA
 8341 TACTTCTCTC TGCTTGTATG ACCCAGCTGG CATCCAAGTA GCCAAAAGAA ACTGTAGCTG
 8401 AGTCCAGCCA TTGCCCCAG CAATGGCAAG GAAAGAGTTT GGAAAGGGGC CAACAGTTGT
 8461 GCAAAACGT ACGAGGGCAG CACAAACATA GGGTGGGACC CTATGAAGCA TAGCTCCAGC
 8521 TTCAGAAATA AAATTCAGTT CGACCTTCGT CTTTGTGGCG GGATGAACTC CTAGAGCACA
 8581 TGCTGCCACT GAACACATCC TGTGTTGCTA ATCACCCTCT CCTCTCTCTC TGTGTGCTCA
 8641 CACACTCATC CCTTCTCCCA CTGACTCCG GGTGTACAT GTTTATGCTC CCTACCAAGA
 8701 AATCTTGGGC TCTGTTTCTT TTCCTTCTCA CAGGCAGAAA GCTCATCTTA AGACTAACAT
 8761 TTCTTTTCTG TATTATTACA GATCGGTGTA AGACGGAGCC ATTTGAAGAA AATCCTCTCT
 8821 TGGAAACAATT TATGGTAGAG GTAGAGTATA CAACAATAAG GATTTTCTTT CTCCTTGTGT
 8881 ACTTTTGTCTT TATTTTCTTT CCAGGTGCCC GAGTAGTGAC TGTGTTTGG GGTGCTAGCT
 8941 GGTGTGCTG GTTGGAGAAAT CCTTCTCTG CAAAAGTTC CTATAGAAAA TCTGTAAAAA
 9001 CTTGAGATGC ATGTGGGGAA GATGGGGTGA AATAGGGGGC AAGACTATGA AAGCCAAAAG
 9061 TGGGCTGCTG AACATTTGTA AAAACATCTG TGCTAACGTA CTTAGGAGTT TCATTAGAA
 9121 TTCCCTAACC TTGGAGAGTT TGGTTGCCCA GTCGATCAA TTTTGTCTG TTGAGATCTG
 9181 ATCAGAGGTC TGGATTGTGG AGCAGGGTGG GGGGAGGAGT CATCATGACT TGCCCTCCA
 9241 ACATCCCA CAAGAGGAAG GTGAAAAGCA CAGGTTTACC ATTTGGGAAC TGTCTGTGG
 9301 Gcaccagtaat ctgtggaaaa tcaccagtgtt tatacaaggg gactggcaaa ggaatgaatg
 9361 gggagtagat aattgtggcc tgcagaagc tctgtcctag gtttctcttc taaggattga
 9421 gcttggccaa aagaacatc tattaacagg caaacagggg agtattaata atagtgaact
 9481 ttgataatac cagteaatat tgattttctc ctctcactct tttaggactt gttggttga
 9541 cagttagtae cttcatetta ttgcccctct ttctaattat acacattaac caagctggta
 9601 ctttactatg taagcaata atgctattat aatatttgtt tctgtataga ttactcgtgt
 9661 ttctgtcttg tcatctaggc tactttgtta actcctgggt gacagggact atgactcata
 9721 tttcttttga acatgaagtt agtatttttc gcagggctag gcagaaagca ggtgtttttg
 9781 acttggaaac ttctgttctg cctctgtgca gtggctgagc aaagacgcca tegtgtttgg
 9841 ggtcttaaca gtgagaacca aaaatgcaag ttgagtgtct aagcctatct cctgaagcaa
 9901 tctaactctg gagaagaagg aaagcatgca ctgtgaagtc ctgagggcaga gtgattttca
 9961 agtctttatg gggaaagaga gccccttaca cctggacttg cacagagatt tctaggcca
 10021 tttttctgtc ggagagcttc ctccgtctct aagtgtaggt ttaaggagg ttaatgcagg
 10081 ctgaggatga tatgtgatt cctgtctct gcccctagt taataatac aagacttatt
 10141 ctccagccag cagagaggtc ccttctgtat ctggtgctg cgtacctatc cagctgggtt
 10201 tcttgagatt tttctttata aaccttaggc ttcagtcaga gaatggcttt gaattgccaa

Figura 1C

4/11

10261 aatgccttcc tctgccttt atgtcttggc acacattgtt tectttatct ataatgccc
 10321 atgccttggc cttatctacc ttgtaaaact ctattaatct tttaatgtgc agctttgget
 10381 tctttgagag acctttccag actctccttg taaagataat ccttcttccc tgcctctata
 10441 gtaccttggg tctacctcc gttttatcac atagaacttt gtgatattac tgtctatagg
 10501 tcttcaagac aatgcctttc tctctgttg atctctgaaa accatctgag ggcaaggact
 10561 gcgttgcatg cttttctata tccccggggc ctgaacatag tgcctgggag tagtagattc
 10621 tctgtaagtt tgtgggtgaa gatgttacta attttgtgct agggggagtc tcatgaaaat
 10681 tggggcagtg tggcctgtgg atatgggtgct gctgtgagac ctaagtttgg ggtcttcagt
 10741 tattctctcg ctttattttg cagcttttga taaattagta ctccagaga ctctgttttc
 10801 ttatttgcaa aattggaggg tcaactcttc catgcttttg gggtaggggc aacctgcag
 10861 agtcgaatga gaaagcatag aatcctgggt ccagccggg gaagagtatt actgcattgg
 10921 aaccaattac caattacttc agaaaatactg gtctcttaag tctgggttgg atcacacca
 10981 aaccacatag acgtacagaa ttttacatat ctgcagagga tctgagagac aagtagctat
 11041 agctttccat ttcacagact aagaaaattg gctcagaga ggttaagtga cttacctaa
 11101 gtcattgtgc tgtagctgta tgttttagagc ctctctacat ttcttctctg ggatctctc
 11161 tattttgttt tgcactctca actgggtgta cacaccaatt aaaggatggg taagggtctag
 11221 gatcatgggg aattattgtg acctctggga tcaactgcat gtctctggg atcaccaaat
 11281 gttctgcata gctgctagaa cccattttct aatgggactg cagaatttct tatggccatt
 11341 gcatcttttc agttactctg cttgtctggg gtctacaaa caggacacag aagggtcatg
 11401 gggtcaccta aaacagctga aaggatgtgc catcaaaata agcaacatag gaagataaac
 11461 aaaccagggg cagagagctc ggggtgaagg tgcagggggg ccagggttga tgtcagaggg
 11521 ccacgcgggc agtgccctggg gtctgttttt cctgggtcta ggcagagggc tggagagata
 11581 gggcacagag ggcagtagga caggaggggt tctaggatac taaggccagg aaaaatattt
 11641 aagggttgaa cagaggttac atcttcatat ttagtctctt tgttttctct cccctacccc
 11701 ccgctttgag ccttggattt etcatttcca gggagcccaa gggggccagt tgatggtggc
 11761 ccgactggag ggggagtgct ggcagtgctc ttcaagtcga ctggacgggg tggcttcagg
 11821 catgattttc atagagggaa gatcctcgta gagagcatct cctaggactg ggagctggga
 11881 ggcaccgtta ggagtaggag atgagtcaac gaatcagggg ccattactgc aaggcagtag
 11941 gaaccgtgtg aaagaagttt aggaggtatc ggtggcatg gcttctctc actctggtcc
 12001 actggaggga gttccttctc cgggccccat ccatgctctc tctctccat ctgggtgcca
 12061 tcaggctgtg tggctgctgg cgggctcttt abttatttat cccagtgtaa tggggtgagg
 12121 agggagctgg cctgaggtg gcatccagag gccatgccac tgagccacag gcggtttgca
 12181 tgggtgtgtg agtcaactgg gctgcatgct gctcaaaaca gacgcggcca ggtcagggg
 12241 cagcaggcag cccaaaatag agccccgcct tctgcagctg gcaaccctg gccaggaate
 12301 agcccttgac accaaaacct gagcaattgc atgaagttgg cttctttcag tgagggtggg
 12361 ggtggggggg gcaottgaca gagagatcct ctcttccct gtcttcagag gagtgtattc
 12421 agcacaatag tcttccccc tgatgcatgc cttatacgat ttaattaat ctgttcaate
 12481 caataccttc agcagtttct atcatatact tatatgacta tagtgacatt gatttgactc
 12541 agcatcctaa atgtagecac agcctttgtg tctgtctag ttttagtact gtcttcatte
 12601 cctgtctggg tgcagcctgt tgcagagca gatgcttcaa gttgtgacga tattcattgc
 12661 tgcctctaga aagctggaag ttatatcaaa gccgcctgg gaagaggagg aggagtcctt
 12721 gaacctggaa attgcttgc gtccagttga gttcattcac ggacagcttc tgcctggttt
 12781 ccttggctgg cgttccattc tttaacctgt ccttaaatgt tagtgttaat tcaaaattgt
 12841 gtctctatcc acttgtcctt ctctctctg gtcatctcat ccagaccca atttgaactg
 12901 tcaactattat accaccaagt gccaaattta tatctcccat catgcagccc atatttctt
 12961 ctgcacattt gatgtttcta cctggatgag tcccacattg tactacccta aacatgtcca
 13021 aaataagcca cccactcccc ctcttctct totgatatte ctaactcttg agaactctac
 13081 ccgtatccat tcagctttct aagccagaaa cttgggagtt actcactttt ctcttctoc
 13141 ttactttcaa atcctacttg tcaactatct ttgaaatctg ctctctctca atctggtgtc
 13201 tgttgccctta gaatagcagc acccaccoga ctaccccac aattgaattt gtattatgtc
 13261 agagtgatct ctttgagaca gaaacagaaa tccagttgct taaagccatt tagtggttca
 13321 aactccttgc atggcacaca gggctgttca tgatttgggt cctctgacct ctacagcttg
 13381 atcctctgac actttcccaa attgaagtcc tgatgcttat ttattccttg accagtggtc
 13441 ctgggattct cttcttctct gtcctcacgg cagactctg ttcagcttct ctgactgcac
 13501 agacatcate ccttttctga gctttccatg accatttct ctttctcttg tctgttttcc
 13561 ttgcgggca aggtacaact tctgtctgtt cccgcgcct cctgtactga ctgacctc
 13621 ccatagcatt tggaggacat ggaacgaaca ggtatgggga atgaaagga aggatgggga

Figura 1D

5/11

```

13681 ggcaaggaaa attgagttgg ctgatctttt ctcatttaga tttttctttt agaagacttg
13741 ttaattcctt ctctcfaatg ttttcttgat atgggttcca tactgcaaca ctctctgtt
13801 tttcttceta ctctcatcgt tgctcctttt cagaatctcc tgctggttct ttctctccct
13861 tactcttttt tttttttttt ttaagatttt atttatttat tcatgagaga cacagagaga
13921 ggacagcaca caggcagagg ggaagcacc tccatgcagg gagcccgatg tgggacccga
13981 tcccagtcct caggatcaca cctgagacca aaggcaggca ctcaaccatt gagccaccca
14041 ggtgtccccc tacttttttt taaagtaatc tgtacaccta acgcagggtt gaactcaca
14101 cgctaacacc ccaagatcaa gaatgcata ctctctgac tgagccagcc aggtgtctgt
14161 cccttacctc ttaatgttgg ggtgcctcag gattcaatca ttggtgtctt tttttaactt
14221 tagtgatctc atatagctcc atggctttta ctaccacttt attgacaaat cccaaattta
14281 atctctaccc tttagacctt cctccaaact cttagactgtc tgcctgatat tcccatgttg
14341 aagtcacaac gaatctgaaa ctctacatgt ccaaaactga acttctaacc ttaccccag
14401 atttgttttt ctaacaacct ccttccatct tagctgatgg aaatgtcacc ttttcatttg
14461 ctaggggcac aaaccttaga gtcactcttg acttctgtct ttttctcata tcccacatct
14521 agtccatcag gaagtcctgt tggccttcaa aacacaccca taatttcacc tttgtctgt
14581 ccactctggt ctgagccaca attgtctctt tcttgcatca ttgcaataac ctctttattg
14641 gtgtctctgc tgtacatct gcccctctct ggccattac cagcaaatgt atctatttaa
14701 aatacagatc acatcatgat actccctgc tcaaatgctt tcattagtct acattacact
14761 tctagagtaa aacctaaagg cctttacagt ggctacaaa gccctacgtg atctggacct
14821 cattaccttt ctgatttcat ctaccacttt cctctctctt tactccattg caccacact
14881 ggocgttgc tgtttttcta gcaacttcta gcaccacttg cctttagtcc tttatgtctg
14941 ccatttctct tgccttgaat gctctttctt cagatatttg tgtggccaag tccctcactt
15001 cctttatgtc tggatttagt atctatcgtc ttataacaca tcattccaaa atgtcatggt
15061 ttaaaaaac aaacagttgt ggaaggtcag gaatttggaa gcagcttagc tgggtgatcc
15121 tgattcaggg tctctcatga agtcacagtc aagatgttgg ctgggaatgt gattattctg
15181 aggcactgga gaattcactt ccaagtctct tcatgtggtt gttggcagga gatgtctgtg
15241 cctgttaaca tgacctctcc atggggttct ttacatgaca tggccctgce tctctccaga
15301 gcaagtgate caaaagacag gcaagactg aaatggaaag tgcagccttt ttataacct
15361 atctcaggag tgacagcaca tcaactctct gtggtgatct ctctcattag agtgaagcag
15421 taaatgtagg ccacattcaa ggggagggtt actaagctcc acctcttaag gggaggtgtg
15481 tcaaaaatac aatacatggt tttgttcaa tgttacctc acaatggagt ttactgtgag
15541 tatectatct aaaaatcata gccacatcct cgcctctctg cacatgactc taattttgat
15601 ttttctcata gcattcatct tccaaacata taaaaattt ccttatttca ttatgtctat
15661 tgttcatggc atcttcccc tgttagagct tgtaagctga gcaaggacaa ggttgyatgt
15721 tttgtgccc ggttcaccca gactacgtag aactctgcct ctacacacag taggcactca
15781 gtacatattt gttgaatgga tgaaggaaat ttagcttccc actcttcttt attttoceta
15841 tcttatgaat aggcattgaa atgatcacc tgttggtagt ctgagacctc gatagcccta
15901 ctataaatag atgagtaacc taaggagaga attgtgttca gattgccatt cattctccca
15961 cctgcctgtt tactgggata taatcccaat tttgggatga actataaacc ttgaatcttt
16021 tattactgaa atccctaaa acctctcttt tagaccagt tcaaaaagca actatctggg
16081 atccctgggt ggccagcagg tttggcgcct gctttggcc cagggcgcga tccctggagc
16141 cgggatcga atcccatatc gggctcccga tgcattggagc ctgcttctcc ctctgectgt
16201 gtctctgect ctctctctct ctctgtgact atcataagta aataaataaa aattaaaaaa
16261 aaaaaaaaaa aaagaaagca actatctcag aaacaaaag aataaagaac taccagggca
16321 cctgggtggc tcagtcggtt aagtgtctgc ctttggctca ggtcatgac tcagggctct
16381 gggattgagc cccacatcag gctcctgtct caacggggag tctgcttctc tctctccctc
16441 tgccccctcc ccccgctgct gtgcgggtgc tcttcttctc tctctgtctc tctctcaaat
16501 gaataaataa aatcttaaaa aaagaaaaag aacctaccaa aatcctggaa agaacttag
16561 tcatacagcc aaaagcaagt taattagttt cctctttctc cagtttttcc tctccctgag
16621 ctgcccctgc accataagcc cgttattcaa tatgtagagg aagacacagg actcagcata
16681 ggtattttca gtatcccatc gggcatcatg aagcaggata aatctagggg catgagactg
16741 tctccgttac catcgtgtgt gtcagtactc tgatctagag aaacttacag ttaattcatt
16801 cttccggtag tcagcatggt gcatgttctt gtggggcata cgggggatga taatattatc
16861 atcaaagagc tcgctgtgct taatgaatga taataggggc tacaatagtg tagtgatttg
16921 aaaaaagctc ctgcaaaagg caggacttga tctggacttc tgtgtttgtc tggggttttg
16981 ctagggaact aggtggaagg cattttagct gggaagcaca tgggcaagg atgtaagtc
17041 ataagtagtg ggtgaggatt agcagaaaaa aaggttagca agatgataac tccaggccag

```

Figura 1E

6/11

```

17101 GTTGTGGGG AGCCTTAAAT GCTGGGCTGG ATGATTGGTA CTTTATTCTG AAGGTAAATG
17161 TATTTTCAGCT TTTTTTTTTT CTGCCAGTAA TCCATTATT TGCCTGTTTC AATCCAGTTA
17221 TTAACATCTA TCATTACACG CAGTGATTCT CAAACAGGCA CATTTCCTTA GGAAGGAGAT
17281 GGGCACTTCC TTCTCGCAGT TATTAATTAC TGTTATAGAT AGTGGGAAGC CGTGGAAAAGT
17341 TTTGGCTGGA GAACTGACAT ATGAAAGCGA TCTTTGGCAA GATTAGGCTG TCAGTGGTAT
17401 GCCTATGTGA GCTGAAGAAT AGTGGTGCTA TTGACAGACT AGGAAAATCA TGGGTGGGGC
17461 TCAATTAAAT CTAATCTTGG GTATACAAAG GAATGGTTTT CCTTATTTAA AACACAAATC
17521 CACCAGTATT TGAGCTCTGG AATGAAAATC TCCAGGGAGG AAGGGATGGC TGCATATGTT
17581 TCTCAGCTAT ATTCTCGGG AATTTTGCCT CCTCTTTGGG GTTTTCTCAA TGTGGTTCCT
17641 GTAGTCACCA TTGAGCCCTG CTACCAGGGG TCACCACCTC TTTTCTTTT GGCCCCAGAA
17701 TATATTAAAA GGCTTCTTTC TTTATATTCC TTTTATAAAA CGTTATAGGG GCTTATGCTT
17761 TCAAAAGAAA ATTTATAAAA AATCTGAGGG CAAACAAAAA GGAAATCAGG ATGAAAATTC
17821 AAATGGGATA AAATTACTGA TATCCAAGAG ATGGATTTCT GATGCTGGGA ATCCTTAATA
17881 GTGGAGATCT TCATTAACTT CTGAATTCTC GTATCCTAAA AGCCTCAAAA TCAAGTGTTT
17941 ACTAACTCAA ATGTCTAAAG GGGACAGACA TACAATATAA ATATGATATC TTATATCAGG
18001 CTGGATATAA TACAACATGT TTTTGGGGGT CTGTGGAAAA CTGAATCGCA CATGCCCCCC
18061 TCTATCTAGA CCCAAATAGG TTAGCACAGT TGAACAGACA CTGTTCTGGG GGCTTGTGTA
18121 GTTTACTTCA CTGAAAGGAA GTACCAGCTC CTTCTAAAAAT

```

Figura 1F

7/11

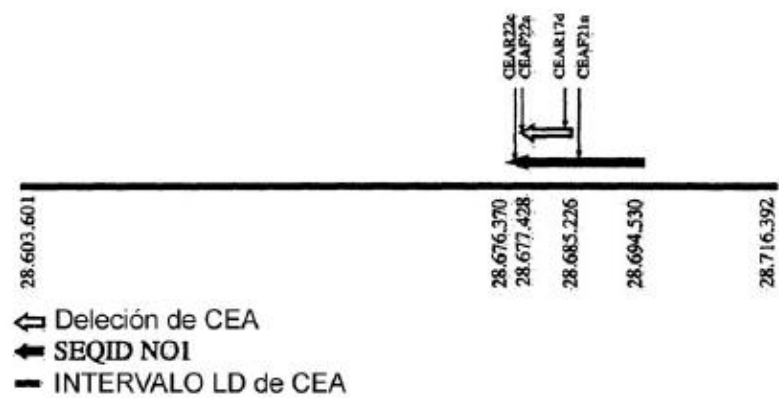


Figura 2

8/17

GACTGGTATTATCAAAGGTCACTATTATTAATACTCCCCTGTTTGCCGTTTAAATAGATGT
TTCTTTTGGCCAAGCTCAATCCTTAGAAGAGAAACCTAGGCAGGAGCTTCTGACAGGCCA
CAATTATCTACTCCCCATTTCCTTTGCCAGTCCCCTTGTATAAACTGTGATTTTC
CACAGATTACTGTGCCCACAAGACAGTTCCCAAATGGTAACCCCTGTGCTTTTCACCTTCC
TCTGCTGTGGGATGTTGGAGGGGCAAGTCATGATGACTCCTCC

Figura 3A

GGAGGAGTCATCATGACTTGCCCCCTCCAACATCCACAGCAGAGGAAGGTGAAAAGCACA
GGGTTACCATTTGGGAACTGTCTTGTGGGACAGTAATCTGTGGAAAATCACAGTGTTTA
TACAAGGGGACTGGCAAAGGAATGAATGGGGAGTAGATAATTGTGGCCTGTCAGAAGCTC
CTGCCTAGGTTTCTCTTCTAAGGATTGAGCTTGGCCAAAAGAAACATCTATTAAACGGCA
AACAGGGGAGTATTAAATAATAGTGACCTTTGATAATACCAGTC

Figura 3B

9/11

CTAGTCTGTCAATAGCACCCTATTCTTCAGCTCACATAGGCATACCACTGACAGCCTAA
 TCTTGCCAAAGATCGCTTTCATATGTCTAGTTCTCCAGCCAAAACCTTCCACGGCTTCCCA
 CTATCTATAACAGTAATTAATACTGCGAGAAGGAAGTGCCCATCTCCTTCCTAGGAAAT
 GTGCCCTGTTTGAGAATCACTGCGTGTAATGATAGATGTTAATAACTGGATTGAAACAGGC
 AAATAAAATGGATTACTGGCAGAAAAAAGCTGAAATACATTTACCTTCAGAATAAA
 GTACCAATCATCCAGCCAGCATTTAAGGCTCCCCAACCAACCTGGCCTCGAGTTATCATC
 TTGCTAACCTTATTTCTGCTAATCCTCACCCTCATTATGACTTTACATCCTTTGCC
 ATGTGCTTCCAGCTAAAATGCCTTCCACCTAGTTCCCTAGCAAAACCCCAACAAACAC
 AGAAGTCCAGATCAAGTCCCTGCCTTTTGCAGGAAGCTTTTCCAATCACTACACTATTGT
 AGCCCCTATTATCATTCAATTAAGCACAGCGAGCTCTTTGATGATAATATTATCATCCCC
 GTATGCCCAACAAGCATGCACCATGCTGACTACCGGAAGAATGAATTAAGTGAAGTTT
 CTCTAGATCAGAGTACTGACACACAGATGGTACGGAGGACA

Figura 4A

TGTCCTCCGTACCATCGTGTGTGTCTAGTACTCTGATCTAGAGAACTTACAGTTAATTCA
 TTCTTCCGGTAGTCAGCATGCTGCATGTTCTTGTGGGCATACGGGGGATGATAATATTAT
 CATCAAAGAGCTCGCTGTGCTTAATGAATGATAATAGGGGCTACAATAGTGTAGTGATTG
 GAAAAAGCTTCTGCAAAAGGCAGGACTTGATCTGGACTTCTGTGTTTGTGGGGTTTT
 GCTAGGGAACTAGGTGGAAGGCATTTAGCTGGGAAGCACATGGGCAAAGGATGTAAAGT
 CATAATGAGTGGGTGAGGATTAGCAGAAAATAAGGTTAGCAAGATGATAACTCGAGGCCA
 G[5]TGTGGGGAGCCTTAAATGCTGGGCTGGATGATTGGTACTTTATTCTGAAGGTAAAT
 GTATTTTCAGCTTTTTTTTTTCTGCCAGTAATCCATTTATTTGCCTGTTTCAATCCAGTT
 ATTAACATCTATCATTACAGCAGTGATTCTCAAACAGGCACATTTCTAGGAAGGAGAT
 GGGCACTTCTTCTCGCAGTTATTAATTACTGTTATAGATAGTGGGAAGCCGTGGAAAGT
 TTTGGCTGGAGAACTGACATATGAAAGCGATCTTTGGCAAGATTAGGCTGTCAGTGGTAT
 GCCTATGTGAGCTGAAGAATAGTGGTGCTATTGACAGACTAG

Figura 4B

10/11

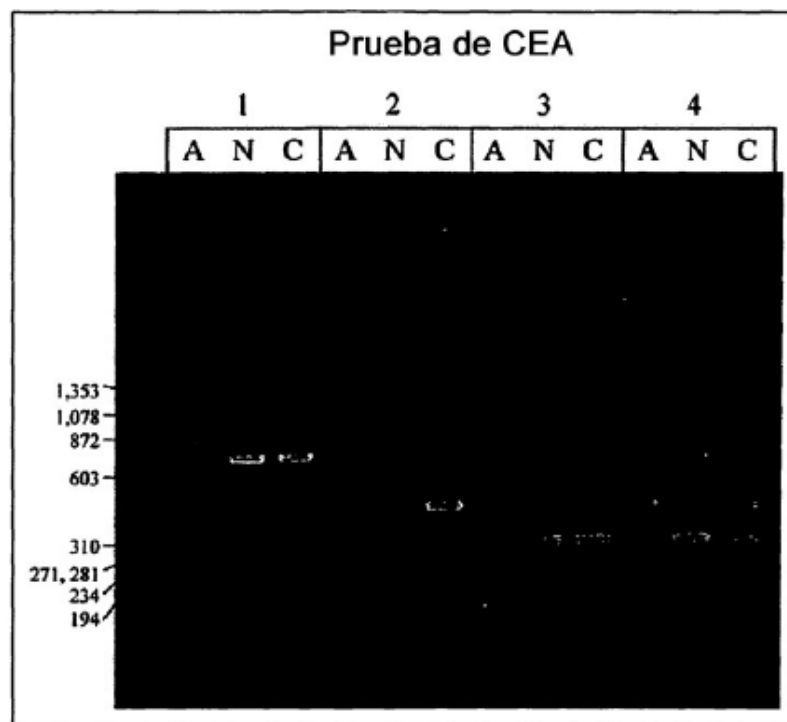


Figura 5

11/11

GGAGGAGTCATCATGACTTGCCCCCTCCAACATCCCACAGCAGAGGAAGGTGAAAAGCACAGG
 GTTACCATTGGGAACTGTCTTGTGG[57]TGTGGGGAGCCTTAAATGCTGGGCTGGATGATT
 GGTACTTTATTCTGAAGGTAAATGTATTTTCAGCTTTTTTTTTTTCTGCCAGTAATCCATTTA
 TTTGCCTGTTTCAATCCAGTTATTAACATCTATCATTACACGCAGTGATTCTCAAACAGGCA
 CATTTCCTAGGAAGGAGATGGGCACTTCCTTCTCGCAGTTATTAATTACTGTTATAGATAG
 TGGGAAGCCGTGGAAAGTTTTGGCTGGAGAACTGACATATGAAAGCGATCTTTGGCAAGATT
 AGGCTGTCAGTGGTATGCCTATGTGAGCTGAAGAATAGTGGTGCTATTGACAGACTAG

Figura 6