

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN ANTONIO ABAD DEL CUSCO**

**FACULTAD DE AGRONOMIA Y ZOOTECNIA**

**ESCUELA PROFESIONAL DE MEDICINA VETERINARIA**



**TESIS**

---

**CARACTERIZACIÓN DE LA SECUENCIA DEL GEN ASIP Y SU VARIABILIDAD  
GENÉTICA PARA EL COLOR BLANCO, CAFÉ Y NEGRO EN ALPACAS  
(*Vicugna pacos*)**

---

Presentada por:

**Br. KARINA ZARATE SURCO**

para optar al título profesional de  
**MÉDICO VETERINARIO.**

**ASESORES:**

**Ing. Zoot. Mgt. Dr. VÍCTOR LÓPEZ DURAND**

**Mvz. PhD. CAROLA MELO ROJAS**

**Mvz. MSc. CELSO ZAPATA COACALLA**

**FINANCIADO: FONDOS CANON - UNSAAC**

**CUSCO - PERÚ – 2023**

# INFORME DE ORIGINALIDAD

(Aprobado por Resolución Nro.CU-303-2020-UNSAAC)

El que suscribe, asesor del trabajo de investigación titulado: CARACTERIZACIÓN DE LA SECUENCIA DEL GEN ASIP Y SU VARIABILIDAD GENETICA PARA EL COLOR BLANCO, CAFÉ Y NEGRO EN ALPACAS (*Vicugna pacos*) presentado por: KARINA ZARATE SURCO con Nro. de DNI: 46985548, para optar el título profesional Médico Veterinario informo que el trabajo de investigación ha sido sometido a revisión por primera vez, mediante el Software Antiplagio, conforme al Art. 6° del *Reglamento para Uso de Sistema Antiplagio de la UNSAAC* y de la evaluación de originalidad se tiene un porcentaje de 9%

Evaluación y acciones del reporte de coincidencia para trabajos de investigación conducentes a grado académico o título profesional, tesis

Porcentaje	Evaluación y Acciones	Marque con una (X)
Del 1 al 10%	No se considera plagio.	X
Del 11 al 30 %	Devolver al usuario para las correcciones.	
Mayor a 31%	El responsable de la revisión del documento emite un informe al inmediato jerárquico, quien a su vez eleva el informe a la autoridad académica para que tome las acciones correspondientes. Sin perjuicio de las sanciones administrativas que correspondan de acuerdo a Ley.	

Por tanto, en mi condición de asesor, firmo el presente informe en señal de conformidad y adjunto la primera hoja del reporte del Sistema Antiplagio.

Cusco, 11 de julio de 2022

  
Ing. Zoot. Víctor López Durand Mgt. Dr.

DNI : 23834214

ORCID : 0000 - 0001 - 5019 - 0269

ASESOR 2: MVE. PhD. CAROLA MELO ROJAS  
DNI: 41821317  
ORCID: 0000-0001-9626-6791

ASESOR 3: MVZ. MSc. CELSO ZAPATA COACALLA  
DNI: 40024530  
ORCID: 0000-0001-6086-380X

Se adjunta:

1. Reporte generado por el Sistema Antiplagio.

2. ENLACE : [OID: 27259: 157757394](https://orcid.org/0000-0001-1577-57394)

  
Victor Lopez Durand

## NOMBRE DEL TRABAJO

CARACTERIZACIÓN DE LA SECUENCIA D  
EL GEN ASIP Y SU VARIABILIDAD GENET  
ICA PARA EL COLOR BLANCO, CAFÉ

## AUTOR

Karina Zarate MV

## RECUENTO DE PALABRAS

19894 Words

## RECUENTO DE CARACTERES

205062 Characters

## RECUENTO DE PÁGINAS

113 Pages

## TAMAÑO DEL ARCHIVO

1.5MB

## FECHA DE ENTREGA

Jul 11, 2022 11:21 AM GMT-5

## FECHA DEL INFORME

Jul 11, 2022 11:28 AM GMT-5

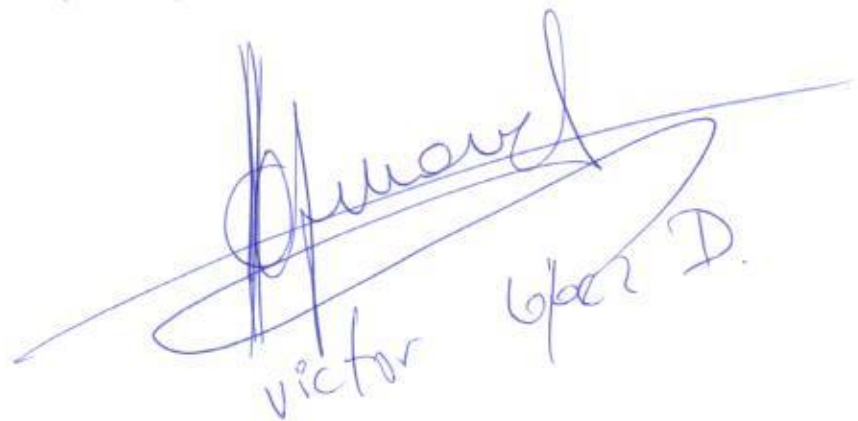
● 9% de similitud general

El total combinado de todas las coincidencias, incluidas las fuentes superpuestas, para cada base de datos

- 8% Base de datos de Internet
- Base de datos de Crossref
- 3% Base de datos de trabajos entregados
- 1% Base de datos de publicaciones
- Base de datos de contenido publicado de Crossref

● Excluir del Reporte de Similitud

- Material bibliográfico
- Coincidencia baja (menos de 10 palabras)
- Material citado



victor Lopez D.

## ÍNDICE

GLOSARIO.....	6
DEDICATORIA .....	1
AGRADECIMIENTO .....	1
RESUMEN.....	3
INTRODUCCIÓN.....	1
I. PROBLEMA DE LA INVESTIGACIÓN .....	2
1.1. PROBLEMA GENERAL.....	3
1.2. PROBLEMAS ESPECÍFICOS .....	3
II. OBJETIVOS Y JUSTIFICACIÓN DE LA INVESTIGACION.....	4
2.1. OBJETIVO GENERAL .....	4
2.2. OBJETIVO ESPECÍFICO .....	4
2.3. JUSTIFICACIÓN.....	5
III HIPOTESIS .....	6
3.1. HIPOTESIS GENERAL .....	6
3.2. HIPOTESIS ESPECIFICA.....	6
IV. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	7
ANTECEDENTES .....	7
MARCO TEORICO.....	10
4.2. LA FIBRA EN ALPACA. ....	10
4.3. VARIABILIDAD DE COLORES EN ALPACAS .....	10
4.4. CARACTERÍSTICAS DE LA PIEL EN ALPACAS.....	10
4.4.1. EPIDERMIS Y DERMIS .....	10
4.4.2. FOLÍCULO PILOSO.....	11
4.5. BIOLOGÍA DEL COLOR DE PELAJE EN LOS MAMÍFEROS.....	11
4.5.1. MELANOSOMAS .....	12
4.5.2. SÍNTESIS DE MELANINA EN MAMÍFEROS .....	12
4.6. PIGMENTACIÓN DE LA PIEL Y FOLÍCULO PILOSO .....	12
4.7. MELANOGÉNESIS .....	13
4.8. GENÉTICA DEL COLOR DE FIBRA.....	13
4.9. PIGMENTACIÓN EN MAMÍFEROS .....	14
4.10. GEN <i>ASIP</i> .....	14

4.10.1. ESTRUCTURA DEL GEN <i>ASIP</i> .....	15
4.11. GEN <i>ASIP</i> EN LA PIGMENTACIÓN DE FIBRA EN ALPACAS.....	15
4.12. SECUENCIA DE NUEVA GENERACIÓN ION S5 <sup>TM</sup> .....	16
4.13. SECUENCIACIÓN DE ADN.....	16
V. DISEÑO DE LA INVESTIGACION.....	17
5.1. UBICACIÓN.....	17
5.2. MATERIAL BIOLÓGICO.....	18
5.3. MATERIALES DE LABORATORIO.....	20
5.4 METODOLOGÍA.....	23
5.4.1. FLUJOGRAMA DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN.....	23
5.5. EXTRACCIÓN DE ADN.....	24
5.7. PREPARACIÓN DE LIBRERÍAS Y SECUENCIACIÓN.....	26
5.8. PREPARACIÓN Y REACCIONES DE AMPLIFICACIÓN DE ADN.....	26
5.9. SECUENCIACION.....	33
5.11. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	34
5.13. DIVERSIDAD GENÉTICA.....	35
5.14. FRECUENCIAS ALÉLICAS Y GENOTÍPICAS.....	36
5.15. ANÁLISIS FILOGENÉTICO.....	38
5.16. DETERMINACIÓN DE HAPLOTIPOS Y ESTUDIO DEL GEN EN LOS TRES FENOTIPOS DE COLOR.....	38
5.17. PRUEBAS DE MODELO NEUTRO.....	39
5.18. TEST DE TAJIMA.....	39
5.19. TEST FS DE FU.....	40
VI. RESULTADOS.....	42
6.1. AMPLIFICACION Y SECUENCIACION DE LA REGION CODIFICANTE Y REGIONES INTRONICAS PARCIALES DEL GEN <i>ASIP</i> EN ALPACAS.....	42
6.2. BÚSQUEDA DE POLIMORFISMOS EN LA REGIÓN CODIFICANTE DEL GEN <i>ASIP</i> .....	42
6.3. ANÁLISIS DE ASOCIACIÓN ENTRE LOS POLIMORFISMOS PRESENTES EN EL GEN <i>ASIP</i> Y FENOTIPOS DE COLOR.....	43
VII. DISCUSIÓN.....	45
VIII. CONCLUSIONES.....	48
RECOMENDACIONES.....	49
BIBLIOGRAFÍA.....	50
ANEXOS.....	60

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Número de alpacas muestreadas.....	19
<b>Tabla 2.</b> Primers del gen ASIP en el genoma de la alpaca.....	26
<b>Tabla 3.</b> Inicio para la amplificación de ADN (reactivos).....	27
<b>Tabla 4.</b> Amplificación del ADN: segundo grupo de cebadores (reactivos).....	27
<b>Tabla 5.</b> Proceso de amplificación de regiones en el termociclador. ....	27
<b>Tabla 6.</b> Proceso de digestión y fragmentación de amplicones. ....	28
<b>Tabla 7.</b> Ligación de adaptadores a los amplicones con Ion Code para generar librerías (reactivos). ....	28
<b>Tabla 8.</b> Ligación de adaptadores, Ion Code y amplicones en termociclador. ....	28
<b>Tabla 9.</b> Proceso de amplificación de biblioteca en el termociclador. ....	30
<b>Tabla 10.</b> Reactivos para la preparación de librerías con fragmento de ADN (reactivo).....	31
<b>Tabla 11.</b> Enriquecimiento de partículas de iones de esferas (ISPs) reactivos.....	32
<b>Tabla 12.</b> Frecuencias alélicas y genotípicas de los polimorfismos encontrados en el gen ASIP en alpacas.....	37
<b>Tabla 13.</b> Definición de haplotipos. ....	39
<b>Tabla 14.</b> Polimorfismos identificados en el gen ASIP.....	42
<b>Tabla 15.</b> Polimorfismos identificados en este estudio, que fueron significativos para el color de pelaje blanco, café y negro en alpacas. ....	44

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Organización de la estructura del gen ASIP en alpacas. ....	16
<b>Figura 2.</b> Ubicación geográfica de centro de investigación CICAS La Raya UNSAAC. ....	17
<b>Figura 3.</b> Selección de animales para la recolección de muestra de sangre. ....	18
<b>Figura 4.</b> Extracción de muestra sanguínea por medio de la técnica de venopunción directa de la vena yugular. ....	19
<b>Figura 5.</b> Extracción de ADN. ....	24
<b>Figura 6.</b> Cuantificación de ADN, usando el equipo Qubit™ Fluorómetro. ....	25
<b>Figura 7.</b> Purificación de librerías usando perlas imantadas. ....	29
<b>Figura 8.</b> Obtención de librería purificado. ....	31
<b>Figura 9.</b> Amplificación por medio de emulsión en el equipo Ion One Touch 2™. ....	32
<b>Figura 10.</b> Programación del termociclador térmico. ....	33
<b>Figura 11.</b> Microchip Ion 520 de secuenciación. ....	33
<b>Figura 12.</b> Ejecución y carga de micro chip 520 en el secuenciador. ....	34
<b>Figura 13.</b> Secuencia aminoacídica del gen ASIP de alpaca, observándose el perfil de dominio AGUTÍ (zona oscura). ....	35
<b>Figura 14.</b> Red de haplotipos utilizando el programa Network v.10.2.0.0. ....	38
<b>Figura 15.</b> Estructura proteica del gen ASIP. ....	41
<b>Figura 16.</b> Organización estructural del gen ASIP en alpacas blancas y de color. ....	43

## GLOSARIO

<b>SNP:</b>	Polimorfismos de un solo nucleótido.
<b>MNP:</b>	Polimorfismos de múltiples nucleótidos.
<b>DEL:</b>	Delección o ausencia de bases nitrogenadas.
<b>INS:</b>	Inserción de bases nitrogenadas.
<b>Epistasis:</b>	Interacción entre diferentes genes para la expresión de fenotípico.
<b>Haplotipo;</b>	Grupo de variaciones del ADN que tienden a heredar juntos.
<b>Gen:</b>	Partícula de material genético.
<b>Cromosoma:</b>	Estructuras halladas en el centro del núcleo con ADN.
<b>Genotipo:</b>	Información genética que posee un organismo en particular, en forma de ADN.
<b>Fenotipo:</b>	Conjunto de características visibles.
<b>ADN:</b>	Ácido desoxirribonucleico.
<b>Exón:</b>	Porción del gen que codifica aminoácidos.
<b>Intrón:</b>	Partes del gen que no codifican.
<b>Alelo:</b>	Formas alternas de un gen.
<b>Homocigoto:</b>	Presencia de dos alelos iguales para una característica.
<b>Heterocigoto:</b>	Intervención de alelos distintos para una característica determinada.
<b>Mutación:</b>	Cualquier tipo de cambio en la secuencia de ADN de la célula.
<b>PCR:</b>	La reacción de la cadena de polimerasa.
<b>Promotor:</b>	Región de ADN que controla la iniciación de transcripción del ADN.
<b>Polimorfismo:</b>	Variación de secuencia de un lugar determinado de ADN
<b>Loci:</b>	Lugar donde se encuentra situado varios genes.
<b>ASIP:</b>	Proteína de señalización agouti.
<b>MC1R:</b>	receptor de la melanocortina
<b>5'UTR y 3'UTR:</b>	Son dos partes no traducidas de un gen.



## DEDICATORIA

A Dios con mucha gratitud, por darme como padres a Agripina Surco M. y Apolinar Zarate Ch., que han sido la base de mi formación y me han ayudado a enfrentar la gran tarea de encarar

A Jose Carlos Arias Flores, Por los momentos de apoyo y perseverancia, así como enseñarme a no rendirme ante cualquier obstáculo y no ponerle excusa a todo.

## **AGRADECIMIENTO**

A todos los docentes de la escuela profesional de Medicina Veterinaria sede Sicuani de la Facultad de Agronomía y Zootecnia por la formación académica que me brindaron.

A los asesores MVZ PhD. Carola Melo Rojas, MVZ. Mgt. Celso Zapata Coacalla y Dr. Víctor López Durand por brindarme su apoyo, paciencia y orientación en todo el proceso del presente trabajo de investigación.

A todo el personal del centro de investigación de camélidos sudamericanos (CICAS "La Raya").

En especial a mi compañero de vida MV. Jose Carlos Arias Flores por su apoyo incondicional en momentos importantes para poder cerrar una etapa importante en mi vida.

## RESUMEN

El presente trabajo de investigación secuenciamos regiones codificantes y no codificantes del gen *ASIP* por medio de secuenciación de ADN de nueva generación Ion Torrent S5 en poblaciones de alpacas de Cusco y Puno. Se analizaron en total 217 muestras, siendo 84 alpacas de color blanco, 59 alpacas de color café y 74 alpacas de color negro, amplificando el 100% de la región codificante y regiones intrónicas parciales con el objetivo de analizar la asociación entre el color de pelaje y el gen *ASIP* en las alpacas.

Se encontró doce polimorfismos de los cuales 10 fueron de tipo SNP, 1 delección de 57 pares de bases y 1 inserción. De estos doce polimorfismos, tres tuvieron una fuerte asociación con el color del pelaje, uno de ellos de tipo sinónimo (c.102A>G), otro ubicado en la región 3'UTR (c.+38A>G) y uno ubicado en la región del intrón 2 (c. +1197G>A), cuatro presentaron una asociación menor, donde uno de ellos fue de tipo no sinónimo (c.292T>C), uno ubicado en la región 3'UTR (c.+10T>C) y dos ubicados en la región del intrón 3 (c.+34C>T y c.+2105A>G). Así mismo se encontró una delección de 57 pares de bases ubicada en la región codificante (c. 324Del 325-381). Se pudo observar que la asociación de polimorfismos (principalmente tres de ellos) podría ser la causa de la pigmentación blanca en estado homocigoto o negra en estado heterocigoto en el vellón de las alpacas y no así en el color marrón donde se encontraron poblaciones en similar cantidad tanto homocigotos como heterocigotos, indicando que la proteína *ASIP* serviría para dar una respuesta a la pigmentación en alpacas blancas y negras.

**Palabras clave:** Gen *ASIP*, color de alpacas, secuenciación de SNPs.

## ABSTRACT

The genetics of coat color in different studies show that the *ASIP* gene has an important role in regulating the synthesis of eumelanin and pheomelanin. In this study we sequenced coding and non-coding regions of the *ASIP* gene by means of Ion Torrent S5 next-generation DNA sequencing in populations of alpacas from Cusco and Puno. A total of 217 samples were analyzed, 84 white alpacas, 59 brown alpacas and 74 black alpacas, amplifying 100% of the coding region and partial intronic regions in order to analyze the association between coat color and the *ASIP* gene in alpacas.

Twelve polymorphisms were found, of which 10 were of the SNP type, 1 deletion of 57 base pairs, and 1 insertion. Of these twelve polymorphisms, three had a strong association with coat color, one of them of a synonymous type (c.102A>G), another located in the 3'UTR region (c.+38A>G) and one located in the region of intron 2 (c. +1197G>A), four presented a minor association, where one of them was non-synonymous (c.292T>C), one located in the 3'UTR region (c.+10T >C) and two located in the region of intron 3 (c.+34C>T and c.+2105A>G). Likewise, a deletion of 57 base pairs located in the coding region (c. 324Del 325-381) was found. It was possible to observe that the association of polymorphisms (mainly three of them) could be the cause of the white pigmentation in the homozygous state or black in the heterozygous state in the fleece of alpacas and not so in the brown color where populations were found in similar quantity. both homozygous and heterozygous, indicating that the *ASIP* protein would serve to give a response to pigmentation in black and white alpacas.

Keywords: *ASIP* gene, alpacas color, SNPs sequencing.

## INTRODUCCIÓN

La crianza de alpacas en el Perú tiene la mayor población a nivel mundial, constituyéndose en Puno y Cusco una mayor cantidad, siendo los principales productores de fibra y que es fuente muy valiosa de sustento económico para pequeños productores.

Requiriendo identificar con éxito mutaciones claves en genes involucrados como el gen *ASIP* en la pigmentación de la fibra, ante el blanqueo inminente de los rebaños de alpacas, que se encuentra poblaciones de alpacas de color en posible extinción por la exigencia del mercado y la demanda de fibra blanca. Con la finalidad de comprender el misterio que rodea la herencia del color en las alpacas empleando enfoques como el mendeliano, físico y genético

La fibra presenta un potencial genético, para obtener ganado selecto, donde los avances de la genética molecular, biotecnología y genómica ya están manifestando logros (Fujita, 2007). La base molecular de la herencia del color de la fibra de alpaca es escasamente conocida (Cransberg y Munyard, 2011). Esto puede deberse a la relación epistática de un gen con otros genes de color de capa, especialmente gen *ASIP* (proteína de señalización agouti) (Powell *et al.*, 2008) Donde el gen *ASIP* regula el cambio entre la síntesis de feomelanina y eumelanina en mamíferos ocasionadas por mutaciones (Chandramohan *et al.*, 2013).

## I. PROBLEMA DE LA INVESTIGACIÓN

La alta demanda del mercado textil ocasiono el blanqueamiento de poblaciones alpaqueras, conllevando a decisiones drásticas como sacas forzadas de alpacas de color (castración de ejemplares en alpacas de color), causando erosión a la variabilidad genética de camélidos. La variedad de tonalidades de fibra en alpaca muestra que el fenotipo blanco es dominante frente al fenotipo pigmentado y asimismo en manchado en alpacas asombrosamente poco o nada se ha realizado en el campo de genética molecular con respecto al color de fibra en alpacas.

El gen *ASIP*, ha demostrado ser clave en la regulación de la producción de pigmentos en mamíferos (Suzukil, 2013), por otro lado, las mutaciones de pérdida de función en el gen *ASIP* dan lugar a animales de color oscuro en presencia de alelos funcionales del gen *MC1R*, ya que la coloración está determinada principalmente por la eumelanina. (Royo *et al.*, 2008).

El propósito de conservar poblaciones de alpacas de color, es por su recurso genético muy valioso para los países andinos, con el fin de formar rebaños de alpacas de color entero.

### **1.1. Problema general**

- ¿Participara el gen *ASIP* en la caracterización de la secuencia y variabilidad genética para el color de fibra en alpacas?

### **1.2. Problemas específicos**

- ¿Existirá la asociación en regiones 5', región 3'UTR y codificadora (exones y parte de las regiones intrónicas) del gen *ASIP* en alpacas de color blanco?
- ¿Guardara asociación en regiones 5', región 3'UTR y codificadora (exones y parte de las regiones intrónicas) del gen *ASIP* en alpacas de color café?
- ¿Mantendrán una asociación en regiones 5', región 3'UTR y codificadora (exones y parte de las regiones intrónicas) del gen *ASIP* en alpacas de color negro?

## II. OBJETIVOS Y JUSTIFICACIÓN DE LA INVESTIGACION

### 2.1. OBJETIVO GENERAL

- Evaluar la secuencia del gen *ASIP* y su variabilidad genética para el color blanco, café y negro en alpacas.

### 2.2. OBJETIVO ESPECÍFICO

- Caracterizar la asociación que existe en regiones 5', región 3'UTR y codificadora (exones y parte de las regiones intrónicas) del gen *ASIP* en alpacas de color blanco.
- Determinar la asociación que existe en regiones 5', región 3'UTR y codificadora (exones y parte de las regiones intrónicas) del gen *ASIP* en alpacas de color café.
- identificar la asociación que existe en regiones 5', región 3'UTR y codificadora (exones y parte de las regiones intrónicas) del gen *ASIP* en alpacas de color negro.



### 2.3. JUSTIFICACIÓN

El color del pelaje es un rasgo de producción importante donde la variabilidad en el color es primordial para la investigación de la función de los genes y la regulación de los loci que afectan la pigmentación (Klungland y Vage, 2003). La proteína de señalización de Agouti (*ASIP*) sirve para regular la pigmentación en ratones, mientras que su papel en muchos otros animales no ha sido completamente determinado (Norris y Whan, 2008; Chandramohan *et al.*, 2013). Se conoce que los genes *ASIP* y *MC1R* están asociados en el color de fibra en alpacas interviniendo en las vías de pigmentación como el tipo, la cantidad y la distribución de los pigmentos de eumelanina y feomelanina de los melanocitos (Bathrachalam *et al.*, 2019; Daverio *et al.*, 2016), estos genes (*ASIP* y *MC1R*) contienen mutaciones que afectan el color (Munyard, 2013) y se sugieren que el melanismo es provocado por la variación en el locus de Agouti y que una gran delección en el gen *ASIP* puede ser responsable del fenotipo eumelanico (Kingsley *et al.*, 2009) para conseguir evidencia adicional del papel del gen *ASIP* en la pigmentación recesiva del color negro es necesario la amplificación de la región promotora del *ASIP* (Royo *et al.*, 2008), Sin embargo, estas mutaciones no explican todos los casos de pigmentación negro ni toda la variación fenotípica que es posible en el gen *ASIP* (Feeley *et al.*, 2011).

### III HIPOTESIS

#### 3.1. HIPOTESIS GENERAL

- Ho: No existe relación al caracterizar la secuencia de gen ASIP y su variabilidad genética para el color blanco, café y negro en alpacas.
- Ha: Existe relación al caracterizar la secuencia de gen ASIP y su variabilidad genética para el color blanco, café y negro en alpacas.

#### 3.2. HIPOTESIS ESPECIFICA

- Existe asociación en regiones 5', región 3'UTR y codificadora (exones y parte de las regiones intrónicas) del gen *ASIP* en alpacas de color blanco.
- Existe asociación en regiones 5', región 3'UTR y codificadora (exones y parte de las regiones intrónicas) del gen *ASIP* en alpacas de color café.
- Existe asociación en regiones 5', región 3'UTR y codificadora (exones y parte de las regiones intrónicas) del gen *ASIP* en alpacas de color negro.

## IV. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

### ANTECEDENTES

Riede *et al.*, (2001), indican que en equinos se hallaron sustituciones intrónicas en, A845G y C2374A, una mutación en 3'UTR A4734G y una delección de 11pb en el exón 2. Donde la delección era homocigoto y está relacionada al color negro recesivo.

Hart, *et al.*, (2003), demostraron que el loci Agouti y Extension tienen interacciones que influyen en la herencia de fibra de color blanca en las alpacas. Donde es controlado por un análogo del alelo dominante ovino agouti, hallado que el locus extensión sea segregante y esta incluya el alelo recesivo Ee y codifique colores feomelánicos

Kerns *et al.*, (2004), mencionaron que diferentes patrones de cambio de tipo de pigmento están controlados por el uso alternativo de diferentes promotores y primeros exones no traducidos. No se descubrió ningún polimorfismo relacionados, pero identificaron que en pastores alemanes negros la sustitución de Arginina (Arg) por una Cisteína (Cys) en el codón 96 que esta sea la responsable de la herencia recesiva en pelo negro.

Norris y Whan., (2008), identificaron una segunda copia de la secuencia de codificación *ASIP* regulada por una copia duplicada de la *ITCH* cercana a un promotor que causa el fenotipo de oveja blanca. Un gen *ASIP* de una sola copia con un promotor *ASIP* silenciado se produce en ovejas negras recesivas.

Royo *et al.*, (2008), mencionaron que la asociación entre diferentes niveles de ARNm del gen *ASIP* y el color negro recesivo del pelaje en la raza de ovejas Xalda presenta una gran cantidad de animales negros y estas no eran homocigotas para la delección de 5 pb que podrían ser la causa de color negro recesivo en ovejas.

Lai *et al.*, (2009), identificaron una delección de 4pb en el exón 3 que son responsables del color de pelaje negro en cobayos, donde halló individuos de tipo salvaje que eran homocigotos para el alelo de tipo salvaje y los otros eran heterocigotos para la delección de 4 pb, mientras que los 44 individuos negros eran homocigotos para la delección.

Feeley *et al.*, (2011), demostraron que en el exón 4 existen ocho mutaciones en alpacas de color (negros, negros y tostados, marrones y beige), cinco en regiones codificantes y tres en región no codificantes, donde, tres de las cinco mutaciones tienen una fuerte asociación color negro.

Chandramohan *et al.*, (2013), identificaron tres mutaciones en alpacas, donde el exón 4 alberga las tres mutaciones recesivas y una delección que provoca pérdida de función del gen *ASIP* en

animales negros y se sugiere que el fenotipo blanco en alpacas puede ser causada por un alelo en el locus *ASIP* y la mutación pueda ser causada por un reordenamiento cromosómico.

Daverio, (2014), refirió que el hallazgo más importante fue la deleción de 57 pares de bases en el Exón 4 con posible pérdida de función, Donde, el alelo delecionado es homocigota en llamas eumelánicas y el alelo sin delecionar es homocigota o heterocigota en llamas feomelánicas.

Daverio *et al.*, (2016), indicaron que polimorfismos del exón 4 del gen *ASIP*, c.325\_381del y c.292C>T produce efectos nocivos en proteína y se encuentran homocigotas en gran cantidad de llamas eumelánicas.

Marin *et al.*, (2018), evaluaron patrones de variación en el gen *ASIP* donde dos de las 12 sustituciones provocan cambio de aminoácido C292T y G353A y una deleción 57pb 325-381 que producen cambios en el marco de lectura del gen *ASIP* y otras siete sustituciones observadas en región de codificación (+C34T, +G48A, +A49C, +G51C, +C56A, C291A, +C10T y +G38A) o son cambios sinónimos (G102A).

Almathen *et al.*, (2018), manifiestan que en dromedarias se encontró dos polimorfismos asociados con el exón 2 que incluye una deleción y un SNP las cuales estas están fuertemente relacionadas con color de pelaje negro y marrón oscuro.

Bathrachalam *et al.*, (2019), demostraron que en alpacas el gen *MC1R* es epistático sobre el gen *ASIP* ocasionado fenotipo negro con la mezcla de alelo recesivo, también confirma el dominio del marrón sobre el negro.

Anello, (2019), indica que el gen *ASIP* tiene una estructura compleja con varios promotores y primeros exones no codificantes que se transcriben en región 5'UTR. Donde, la sobreexpresión que existe es causada por un transcripto cuya región 5'UTR pertenece al gen *NCOA6* sugiriendo que este reordenamiento afecte a fenotipos blancos y feomelánicos.

Daverio *et al.*, (2019), revelaron que en todas las llamas oscuras fueron homocigotas para la deleción, homocigotas para el polimorfismo c.292C> T o heterocigoto para ambas expresiones, pero ninguna de esta mezcla se halló en animales feomelánicos.

Alshanbari *et al.*, (2019), confirman que gran parte de los dromedarios negros son homocigotos para una mutación en el exon 2 y exon 4 del gen *ASIP*. En la búsqueda de más mutaciones subyacentes al color de pelaje negro hallaron otra mutación de cambio de marco en el exon 4.

Shang *et al.*, (2019), mencionaron que en siete fenotipos de color de pelaje en equinos (negro, marrón, castaño oscuro, castaño, blanco y gris). La frecuencia de fenotipos en el gen *ASIP* fue en el color castaños con un 83% respecto a los otros colores. los genes *ASIP* y *MC1R* trabajan de manera sinérgica con relación a la cantidad de melanina.

Pallotti *et al.*, (2020), encontraron que todas las alpacas negras eran heterocigotos para alelos no funcionales en el locus *ASIP*, también encontraron alpacas de pelaje pardo heterocigotas u homocigotas para el alelo *ASIP* dominante. Cabe señalar que los genotipos negros se caracterizan por una alta heterogeneidad alélica recesiva.

## MARCO TEORICO

### 4.2. LA FIBRA EN ALPACA.

La fibra de la alpaca tiene cualidades, como calidez, suavidad (Wang *et al.*, 2005), que refiere como fibra especial y está clasificada como artículo de lujo por suavidad al tacto (Quispe *et al.*, 2009). La demanda de fibra blanca aumentó a diferencia de la fibra de color generando el denominado blanqueamiento (Huanca *et al.*, 2007), por suerte la demanda creciente en la industria textil se debe a la amplia variedad de colores naturales, ya que permite una diversidad de combinaciones (Trejo, 1986).

En razones económicas y de conservación genética es importante mantener la variabilidad de color, dado que la fibra de color es una alternativa para promover y capitalizar los telares artesanales (Caballero y Flores, 2004).

### 4.3. VARIABILIDAD DE COLORES EN ALPACAS.

Existe una extensa variabilidad de colores, que va desde el blanco, cafés, gris, hasta el negro (Bustinza, 2001), que tiene la capacidad de un alto índice de solidez ante los rayos solares, lavado, uso y proceso físico químico (Trejo, 1986), la herencia del color blanco se debe a un solo gen que predomina sobre los pigmentados, sin ningún efecto modificador e independiente de la segregación de los patrones negro y marrón. Sin embargo, la evidencia no respalda la dominancia simple del negro contra el marrón. (Valbanesi *et al.*, 2011), de igual forma los mecanismos genéticos de los rasgos de vellón muestran que el fenotipo blanco es dominante sobre el fenotipo pigmentado y el fenotipo manchado (Frank *et al.*, 2006).

### 4.4. CARACTERÍSTICAS DE LA PIEL EN ALPACAS.

La estructura de la piel de alpaca es parecida a otros mamíferos (Torres de Jasuai *et al.*, 2007), conformada por tres capas bien definida epidermis, dermis y la hipodermis (Chambilla, 1983; Lancera, 1993; Bustinza, 2001), así como también en otras características como los folículos pilosos y glándulas anexas (Torres de Jasuai *et al.*, 2007).

#### 4.4.1. EPIDERMIS Y DERMIS

La epidermis está formada por epitelio estratificado, plano y queratinizado (Bustinza, 2001) con un grosor aproximado de 60  $\mu\text{m}$  (Torres de Jasuai *et al.*, 2007), 29.94 micras en alpacas jóvenes

(Gonzales y Pumasupa, 2005). Presenta cuatro estratos diferenciados por la morfología de los queratinocitos (Estrato basal, espinoso, granuloso, corneo). El estrato corneo formado por escamas llenas de queratina este estrato esta superficial. El estrato granuloso formado por una capa de células planas (Bustinza, 2001). El estrato basal, formado por células cúbicas de aspecto cilíndricos, de citoplasma claro y ligeramente basófilo en el polo basal, su núcleo redondeado de cara abierta y los melanocitos están en contacto con la membrana basal, evidenciado la coloración (Torres de Jasauí *et al.*, 2007)

La dermis constituida de tejido conectivo contiene fibras de colágeno que en su lecho se hallan folículos pilosos, glándulas sebáceas, glándulas sudoríparas. La dermis superficial es delgada y presenta tejido conectivo laxo con bastantes células conjuntivas o fibrosas y se denomina como lamina propia que está ubicada en la parte profunda (Bustinza, 2001).

#### **4.4.2. FOLÍCULO PILOSO**

La fibra de alpaca es una estructura queratinizada, están orientados en ángulo agudo entre el bulbo piloso y la piel. La matriz pilosa tiene células epidérmicas altamente modificadas llamadas células matriciales, de forma poliédrica y contiene melanina, entre las cuales se encuentran algunos melanocitos. La matriz está en constante mitosis, con el fin de formar fibra: la médula contiene células con gránulos de melanina en su raíz y que disminuyen a medida que crece la fibra, la corteza está formada por células muy cohesionadas y la cutícula de la fibra muy fina. (Torres de Jasauí *et al.*, 2007).

Los grupos foliculares están formados por uno o más folículos primarios y un número variable de folículos secundarios; sin embargo, en las alpacas Suri se observa un trío folicular primario, caracterizado por presentar un folículo primario central y dos laterales (Badajoz *et al.*, 2009).

#### **4.5. BIOLOGÍA DEL COLOR DE PELAJE EN LOS MAMÍFEROS.**

La pigmentación en mamíferos es un proceso altamente conservado, Las diferencias que vemos entre especies son causadas por la variación dentro de los genes que controlan el color (Munyard, 2013), por lo tanto, se caracterizan por una gran variabilidad alélica de genes que se asocian al color del pelaje, existen 300 locis genéticos hasta la fecha y más de 150 genes identificados y asociados con el color del pelaje, que influyen en la pigmentación en varias especies (Cieslak *et al.*, 2011).

La embriología de la pigmentación se da en las células de la cresta neural que se distinguen en melanoblastos que después llegan a migrar a lo largo de la espalda y hacia los lados del cuerpo.

A medida que migran, se diferencian en melanocitos que estos producen orgánulos internos llamados melanosomas en los que los gránulos de pigmento son la melanina a todo este proceso se denomina melanogénesis. Los melanosomas maduros se exportan del melanocito a células especializadas de la piel y el cabello llamadas queratinocitos, para producir el fenotipo, el color visual que podemos observar (Munyard, 2013).

#### **4.5.1. MELANOSOMAS**

Son organelos citoplasmáticos con enzimas que participan en la síntesis de los pigmentos melánicos y son transferidos a los queratinocitos vecinos (Ochoa, 2006). El desarrollo se da en cuatro etapas distintas. Durante la etapa I, el melanosoma se desarrolla por una pieza del retículo endoplásmico. Luego, se transporta al melanosoma y esta se divide en su forma activa. Desarrollando una estructura fibrilar dentro del melanosoma durante la Etapa II, con el fin de estabilizar el melanosoma (Munyard, 2013). Las enzimas que participan en la síntesis de melanina se hallan en los melanosomas (Sulaimon y Kitchell, 2003). La etapa III da origen a la melanogénesis, y la etapa IV se consigue cuando el melanosoma está repleto de pigmento y está listo para el transporte a los queratinocitos (Munyard, 2013).

#### **4.5.2. SÍNTESIS DE MELANINA EN MAMÍFEROS**

La síntesis de melanina se desarrolla dentro del melanosoma, existen dos tipos de melaninas en mamíferos, eumelanina y feomelanina. La eumelanina da coloraciones oscuras, negro o marrón, mientras que la feomelanina normal es de color amarillo a rojo. Para ambos tipos de melanina la molécula precursora es el aminoácido tirosina. Esta se transforma a través de una serie de reacciones y productos intermedios en feomelanina o eumelanina. (Munyard, 2013). El tipo de melanina sintetizada por los melanocitos en los mamíferos está regulada a nivel genético, bioquímico y ambiental (Sulaimon y Kitchell, 2003).

#### **4.6. PIGMENTACIÓN DE LA PIEL Y FOLÍCULO PILOSO.**

En mamíferos el color del pelaje se debe a la acción de la melanina que es sintetizada a partir del aminoácido Tirosina y se divide en dos grupos distintos, se ha determinado que la feomelanina se presenta por una desviación de la eumelanina debido a la acción del aminoácido cisteína (Castrignano *et al.*, 2001). En seres vivos la piel y sus componentes asociados permiten sobrevivir en diversos ambientes ecológicos (Meruane y Rojas, 2012). Los genes que están involucrados en la pigmentación del pelaje pueden actuar de manera pleiotrópica o epistática (Yajima y Larue, 2008). Además, existe una gran variabilidad de tonalidades en el color de la fibra, que va desde



colores claros hasta oscuros (Bustinza, 2001). De tal forma la cantidad de eumelaninas disminuye de negro a marrón rojizo (Cecchi *et al.*, 2004).

Los camélidos sudamericanos tienen un gran grupo de sustancias denominadas melanina (Ruiz de Castilla, 2004). Se sabe que ciertos melanocitos derivan de células inmaduras procedentes del área ventral del tubo neural y presentes en las fibras nerviosas cutáneas (Adameyko *et al.*, 2009). Su principal actividad es la producción de melanina, aportando pigmentación en la piel, ojos y pelo (Portocarrero y Poteros, 2009).

#### **4.7. MELANOGÉNESIS.**

Durante la melanogénesis se identificaron más de 150 genes diferentes que regulan la pigmentación en ratones (Miller *et al.*, 2012). Los melanoblastos manifiestan una serie de genes que están involucrados en la supervivencia de células melanocíticas, (determinación, migración y proliferación) (Lin y Fisher, 2007), de esta manera los genes implicados en la regulación del pigmento en el pelo del ratón, ha permitido describir a sus homólogos en el ser humano (Mantoux, 2003).

Una transcripción esencial entre la expresión y diferenciación de muchas enzimas implicadas en la síntesis de melanina es la clave de la melanogénesis, tirosinasa (McGill *et al.*, 2002). La tirosinasa (TYR) ejecuta la hidroxilación de tirosina a L-3,4-dihidroxifenilalanina (DOPA) que se oxida con prisa a DOPAquinona (Fitzpatrick *et al.*, 1967). La DOPAquinona reacciona con la cisteína, produciendo 3 o 5-cisteinil-DOPA, que luego se oxidan y polimerizan, dando lugar a melanina soluble de color rojo-amarillo-feomelanina (Simon *et al.*, 2009; Hearing, 2011) En ausencia de cisteína, glutatión o tiorredoxina, se origina la eumelanina aportando pigmentación marrón oscuro. La DOPAquinona se cicla a DOPAchrome (Sugumaran, 1991) la DOPAchrome pierde el enlace ácido carboxílico generando 5,6-dihidroxiindol (DHI), que se oxida con facilidad y se polimeriza para desarrollar melanina insoluble marrón oscuro-negra. Sin embargo, si está presente DOPA - cromo tautomerasa (TYRP2 / DCT), DOPAchrome formará ácido DHI - 2 - carboxílico (DHICA) (Marmol y Beermann, 1996). La tirosinasa cataliza nuevas mutaciones obteniendo por último un color marrón más claro DHICA-melanina (Simon *et al.*, 2009; Slominski *et al.*, 2004)

#### **4.8. GENÉTICA DEL COLOR DE FIBRA.**

Algunos factores reguladores del tipo y cantidad de la melanina incluyen la radiación ultra-violeta (UV), hormona estimuladora de melanocito - alfa ( $\alpha$ -MSH) y la señal proteína agouti (*ASIP*). Estos

factores regulan la expresión de los genes que codifican las 7 enzimas melanosómicas, quienes regulan la proporción de eumelanina y feomelanina (Sulaimon y Kitchell, 2003).

Los genes candidatos para causar tal dilución incluyen la tirosinasa y proteína de transporte asociada a la membrana, en otras especies ambas se han asociado para la dilución del color del pelaje. Es posible que la dilución del color esté influyendo principalmente en animales que retardan su concentración total de melanina, en oposición a concentraciones relativas de feomelanina y eumelanina (Cransberg y munyard, 2011).

En el control genético del color de fibra en alpacas existen escasos estudios, donde, los principales genes que regulan el color de fibra son: a) colores básicos como: Locus Agutí (*ASIP*) regula los pigmentos negros morenos o pardos, siendo los colores pardos dominante sobre el negro, Locus Extensión, formado en primer lugar el negro dominante con relación a otros genes de este locus, segundo alelo regula la expresión del locus Agutí (sponenberg, 2004).

#### **4.9. PIGMENTACIÓN EN MAMÍFEROS.**

La variación del color en mamíferos nos facilita una visión fundamental de la biología del color. En la mayoría de los vertebrados se ha encontrado dos genes claves, el gen Agouti (*ASIP*) y el receptor de Melanocortina 1 (*MC1R*) que codifican un método ligando-receptor que regula el cambio de tipo de pigmento y están involucradas en todas las etapas de la pigmentación (Candille *et al.*, 2007), *MC1R* codifica un receptor de la familia de la melanocortina y tiene un papel importante en la síntesis de eumelanina o feomelanina, en los melanocitos. Cuando la hormona estimuladora de los melanocitos ( $\alpha$ -*MSH*) se liga al receptor *MC1R*, se incrementan los valores intracelulares de *AMP* ciclico y la actividad de la enzima tirosinasa. Como efecto de la producción de eumelanina en los melanocitos se une al receptor *MC1R* por medio de un ligando alternativo y la proteína de señalización agouti (*ASIP*), se reduce la actividad de la tirosinasa y se sintetiza feomelanina (Parra, 2011).

#### **4.10. GEN *ASIP*.**

El gen *ASIP* ejerce su acción dentro del microambiente donde se ubica el folículo piloso para regular la pigmentación del color del pelaje (Bultman *et al.*, 1992). La expresión de la proteína de señalización agutí (*ASIP*) que actúa durante el crecimiento del pelo y produce la coloración roja / amarillo feomelanina, también es un antagonista de los receptores de melanocortina *MC1R* (Miltenberger *et al.*, 2002). El gen *ASIP* en ratones ocasiona un efecto pleiotrópico caracterizado por el color amarillo uniforme, obesidad, sobrecrecimiento y trastornos metabólicos similares a la

diabetes tipo II en humanos. (McNulty *et al.*, 2005), asimismo las mutaciones ocasionadas en el gen *ASIP* produce el fenotipo de color negro en varias especies (Lai *et al.*, 2009), ocasionado recombinaciones homólogas (Chen *et al.*, 1996).

#### **4.10.1. ESTRUCTURA DEL GEN *ASIP***

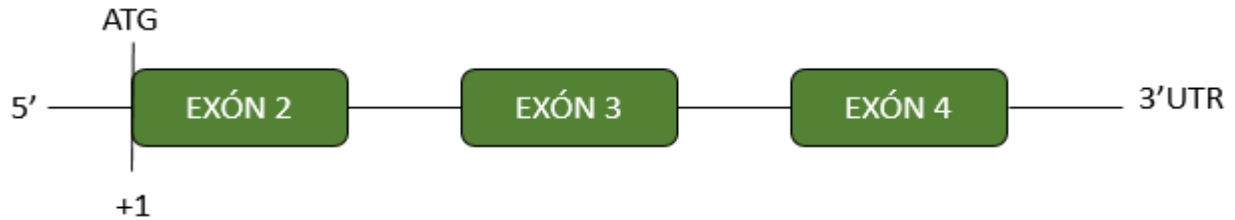
La proteína de señalización agouti en el proceso de crecimiento del cabello ocasiona el pigmento rojo / amarillo feomelanina. La síntesis y la estructura del dominio C-terminal, buena concentración de cisteína, donde el gen *ASIP* acoge al inhibidor de pliegue de cistina y, conjuntamente con su homólogo de neuropéptidos de la proteína relacionada con agouti (AgRP), son solo estas proteínas con esta clase de estructura en mamíferos. Además. Los estudios demuestran que la conformación menor con dos enlaces de péptida cisteína es responsable de la actividad en todos los receptores de *MCR* (McNuty *et al.*, 2005). En ratones se han descrito en promedio 100 alelos en el gen *ASIP* con diferentes efectos en el fenotipo (Dunner, 2014).

#### **4.11. GEN *ASIP* EN LA PIGMENTACIÓN DE FIBRA EN ALPACAS.**

El gen de la proteína de señalización agouti (*ASIP*) en alpacas contiene 402 nucleótidos de largo (Feeley *et al.*, 2011), que además tiene tres exones codificantes 2, 3 y 4. El exón 1 no está codificado en otras especies, el exón 2 engloba 160 pb, el exón 3 con 65 pb y el exón 4 con 177 pb a lo largo de gen *ASIP* en la Alpaca siendo más grande que en los homólogos de humanos, perros y ratones y más corto que el gato. El gen *ASIP* es muy similar al de otras especies, con un 89% de similitud entre alpacas y ovejas, vacas y cabras, y un 88% de similitud con los cerdos.

En alpacas, el gen *ASIP* tiene 133 aminoácidos de longitud y es muy semejante a los homólogos en ovejas, vacas (83%) y caballos (81%) (Munyard, 2013). En contraste, el alelo dominante (A) del gen *ASIP* produce un patrón de color amarillo-rojo, mientras que el alelo recesivo (a) está asociado con un negro uniforme. Las mutaciones ocasionan pérdida de función del gen *ASIP* relacionadas con fenotipos de pigmentación negra se han descrito en varias especies como en alpacas (Bathrachalam *et al.*, 2019), llamas (Anello, 2019), dromedarios (Almathen *et al.*, 2018) ovinos (Royo *et al.*, 2008), equinos (Rieder *et al.*, 2001), y caninos (Kerns *et al.*, 2004).

**Figura 1. Organización de la estructura del gen *ASIP* en alpacas.**



#### **4.12. SECUENCIA DE NUEVA GENERACIÓN ION S5™.**

El sistema de secuenciación masiva de genes está generando buena cantidad de referencias genómicas que se pueden utilizar en estudios ecológicos y evolutivos, también están relacionados con conservación, manejo y análisis de la diversidad biológica de SNP, como análisis de genomas completos con el fin de resolver problemas taxonómicos, filogenéticos, de biología de la conservación de ecosistemas (Escalante *et al.*, 2014). Esta tecnología es referencia de muchas publicaciones a la fecha. Existe cuatro tipos de chips en la actualidad que llegan a obtener un rango de 2 a 80 millones de repeticiones, este metodo de semiconduccion ionica de hidrogeno es liberada y traducida en señal quimica que agrega una base nitrogenada (G,T,A,C) obteniendo información en forma digital del chip de modelo 520 (Frank *et al.*, 2006).

#### **4.13. SECUENCIACIÓN DE ADN.**

La secuencia de DNA tiene uno de los aspectos valioso para la biología moderna, donde el desarrollo de la tecnología de secuenciadores de DNA automatizados es de mucha utilidad. La aplicación de tecnología de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en la secuenciación de DNA, la cual ha sido sometido al desarrollo de la secuenciación de amplificación lineal (Griffin y Griffin, 1993). Es el proceso mediante el cual se determina el orden de las bases nucleicas (Adenina, Guanina, Citosina y Timina) a lo largo de un segmento de ADN (Pacheco *et al.*, 2015). El método más utilizado es de tejido sanguíneo (glóbulos rojos inmaduros, glóbulos blancos) donde la secuenciación, desnaturalización y la combinación de un cebador ocasiona acción sobre la polimerasa de ADN. La incorporación de nucleótidos en la cadena se produce cuando un nucleótido se une y previene la unión de otros, esto genera la formación de fragmentos de DNA marcados con fluorescencia y estos se separan por medio de electroforesis, migran por el capilar y recorren por un láser. La función de la fluorescencia fija el orden del color de las bandas y estas se traducen en secuencia de DNA si existen cambios al compararlas con la secuencia original esto se denomina como mutación (Martín *et al.*, 2008).

## V. DISEÑO DE LA INVESTIGACION

### 5.1. UBICACIÓN.

Lugar donde se realizó el estudio de investigación fue en el Laboratorio de Genética que pertenece al Centro de Investigación CICAS La Raya UNSAAC a una latitud -71.018717, longitud -14.47468 del departamento de cusco.

**Figura 2. Ubicación geográfica de centro de investigación CICAS La Raya UNSAAC.**



Imágenes © 2023 CNES / Airbus, Maxar Technologies, Datos del mapa © 2023 200 m

Las muestras se llegaron a obtener del Fundo Chaupi Wasi (Marangani) provincia de Canchis y departamento de Cusco y está ubicado en las coordenadas de Altitud: 4608 m.s.n.m. Latitud Sur: 14°14'24.9" Longitud Oeste: 070°50'52.2'. Centro de Investigación de Camélidos Sudamericanos (CICAS) la Raya de la Universidad Nacional San Antonio Abad del Cusco ubicado a 14°28'42,59" de latitud sur y 71°01'41,55" de longitud oeste, a una altura de 4120 msnm. Fundo Oquemarca (Phinaya) en la región Cusco entre las coordenadas Altitud: 4831 m.s.n.m. Latitud Sur:

13°53'43.3" Longitud Oeste: 70°58' 56.2" y CAP Huaycho (Ñuñoa), Provincia de Melgar y departamento de Puno ubicado a una Altitud: 4316 m.s.n.m. Latitud 14°16'43.5"S y longitud 70°33'02.4".

**Figura 3. Selección de animales para la recolección de muestra de sangre.**



**Fuente:** Lugares de muestreo, CICAS La Raya (a), fundo Chaupi Wasi (b), fundo Oquemarca (c) y fundo CAP Huaycho.

## 5.2. MATERIAL BIOLÓGICO.

La muestra sanguínea se obtuvo por medio de punción directa en la vena yugular de la alpaca (Rockett y Bosted, 2015), en una cantidad de 3 mL utilizando tubos al vacío estériles con anticoagulante EDTA (ácido etilendiaminotetraacético) y agujas 21G para obtener buena cantidad de ADN. Luego se almacenaron en un termo de transporte con bolsas de geles congelados a fin de mantener la cadena de frío, en promedio de tres horas hasta llegar al laboratorio del Centro de Investigación de Camélidos Sudamericanos (La Raya) para su conservación a temperaturas de  $-20^{\circ}\text{C}$ . En total se obtuvieron 217 muestras de sangre tal como se muestra en la siguiente tabla.

**Tabla 1. Número de alpacas muestreadas.**

Lugar de procedencia de muestras	Color de fibra		
	Blanco	Café	Negra
Fundo Chaupi Wasi - región Cusco	39	6	2
Fundo Oquemarca - región Cusco	36	28	32
Centro de investigación CICAS La Raya – UNSAAC	2	18	37
Fundo CAP Huaycho – región Puno	7	7	3
Total	84	59	74

**Figura 4. Extracción de muestra sanguínea por medio de la técnica de venopunción directa de la vena yugular.**



### **5.3. MATERIALES DE LABORATORIO.**

#### **5.3.1. EXTRACCIÓN DE MUESTRAS**

- Algodón.
- Alcohol.
- Tubo vacutainer de 3 ml con EDTA.
- Jeringa de 3ml.
- Guantes de exploración.
- Plumón indeleble.
- Cinta masking.
- Sogas.
- Gradilla de plástico
- Termo de transporte
- Bolsas de geles congelados

#### **5.3.2. EXTRACCIÓN DE ADN**

- Mandil descartable.
- Guantes de nitrilo (Talla S)
- Barbijo.
- Lentes.
- Temporizador (Fisherbrand™).
- Puntas descartables de 2, 10, 20, 100, 200, 1000 microlitros.
- Tubos de 2 y 1.5 ml (Eppendorf).

##### **a. Reactivos del kit comercial**

- Kit de purificación de ADN genómico GeneJET Scientific Thermo # K0721, K0722 # - Pub. N° MAN0012663

##### **b. Equipos para la extracción de DNA**

- Centrífuga 16'000 gravedades (Spectrafuge 24D Labnet).
- Congeladora a -20°C (Thermo Fisher TSX).
- Refrigeradora a 2 a 8°C (Thermo Fisher TSX).
- Cámara de flujo laminar (Biobase Modelo BBS-H1100).



- Vortex (Thermo Scientific™).
- Micropipetas de varios volúmenes (Thermo Scientific™ Kits)
- Termociclador (Thermo Fisher Applied Biosystems).
- Calefactores (OFR11AO 2500W).

### **5.3.3. CUANTIFICACIÓN DEL DNA**

#### **a. Materiales y reactivos para la cuantificación de DNA**

- Tubos eppendorf (Thermo Fisher).
- Micropipetas (Thermo Fisher).
- Gradillas de plástico.
- Lapicero indeleble(marcador)
- fluorometro Qubit™.

#### **b. Equipo para la cuantificación del DNA**

- Calentador de bloques para tubos de ensayo 8887000 series.
- Vortex (Thermo Scientific™ LP y USA Scientific).
- Microcentrifuga (mySPINTM 12 Mini centrifuge – Thermo Fisher).
- Cuantificador del ADN (Qubit™ Fluorometro - Thermo Fisher).

### **5.3.4. SECUENCIACIÓN DE DNA**

#### **a. Materiales y reactivos para la secuenciación de DNA**

- Mandil descartable.
- Guantes de nitrilo.
- Temporizador (Fisherbrand™).
- Puntas descartables de 2, 10, 20, 100, 200, 1000 microlitros.
- Tubos de 2 y 1.5 ml (Eppendorf).
- Lapicero indeleble.
- Barbijo.
- Lentes.
- Gradillas de plástico

**b. Reactivos de la secuenciación.**

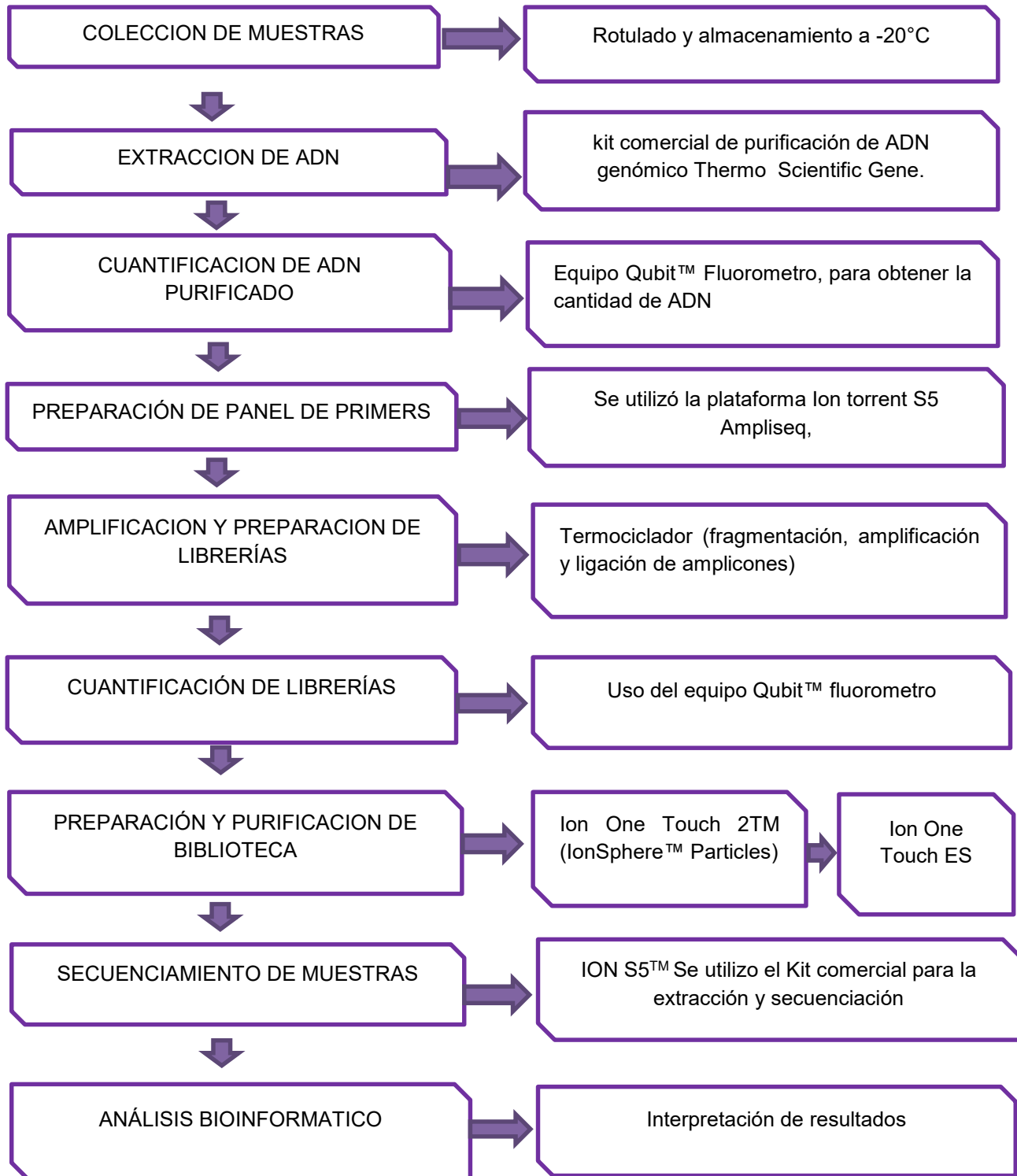
- Ion AmpliSeq™ Library Kit 2.0 - DNA Library Preparation with 1- or 2-Pool Panels Using Qubit™ Fluorometer or Agilent™ 2100 - Bioanalyzer™ Quantification - Catalog Numbers 4475345, 4480441, 4480442, 4479790, A31133, A31136, A29751 - Pub. No. MAN0006943 Rev. C.0.
- Ion 520™ & Ion 530™ Kit – OT2 - Catalog Number A27751 - Pub. No. MAN0010849 Rev. D.0.

**c. Equipos para la secuenciación de DNA**

- Centrifuga (Thermo Fisher de placa).
- Congeladora (Thermo Fisher TSX).
- Refrigeradora (Thermo Fisher TSX).
- Cámara de flujo laminar (Biobase Modelo BBS-H1100).
- Vórtex (USA Scientific).
- Agitador (Vortex LP Thermo Fisher).
- Microcentrifuga (mySPIN™ 12 Mini centrifuge – Thermo Fisher).
- Microcentrifuga de chip (Ion Chip Minifuge – Thermo Fisher)
- Micropipetas (Thermo Scientific™ Kits Finnpiptette™ F2 GLP).
- Termociclador (Thermo Fisher Applied Biosystems).
- Calefactores (OFR11AO 2500W).
- Preparación de librerías y amplicones (Ion ToCh 2 Thermo Scientific™, Ion ToCh E1 Thermo Scientific™)
- Secuenciador (ION S5™2 Thermo Scientific™)

## 5.4 METODOLOGÍA.

### 5.4.1. FLUJOGRAMA DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN.



Fuente: elaboración propia

## 5.5. EXTRACCIÓN DE ADN.

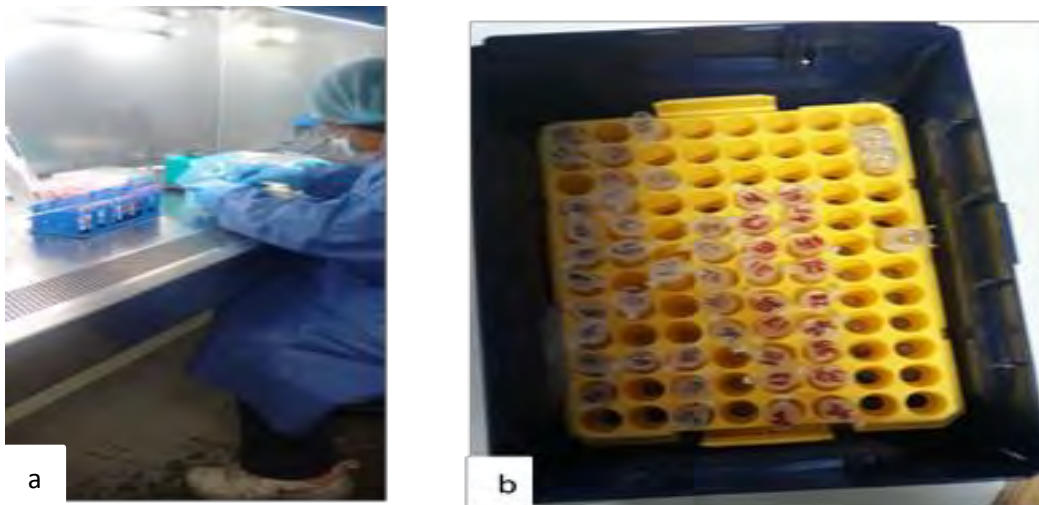
Se retiró las muestras almacenadas para el procesamiento a temperatura ambiente de 22 °C, luego registrar individualmente. Se utilizó 200 µL de sangre de cada muestra, agregándose a la muestra 20 µL proteinasa K para homogenizar (vortex).

Se agregó 400 µL de solución de lisis se homogeniza, para luego incubar a 56°C por 10 minutos luego se transfirió a la columna de centrifugados por un min a 6,000 x g (8,000 rpm), se desechó el tubo de recolección para colocar la columna en un nuevo tubo de recolección de 2mL.

Se agregó 500 µL wash buffer WB I (con etanol) se centrifugó por un min a 8,000x g (10,000rpm) nuevamente se desechó el contenido y se colocó otra columna en el tubo recolector, seguidamente se agregaron 500 µL de wash buffer II (con etanol) durante 3 min a velocidad máxima 20,000 x g (14,000rpm).

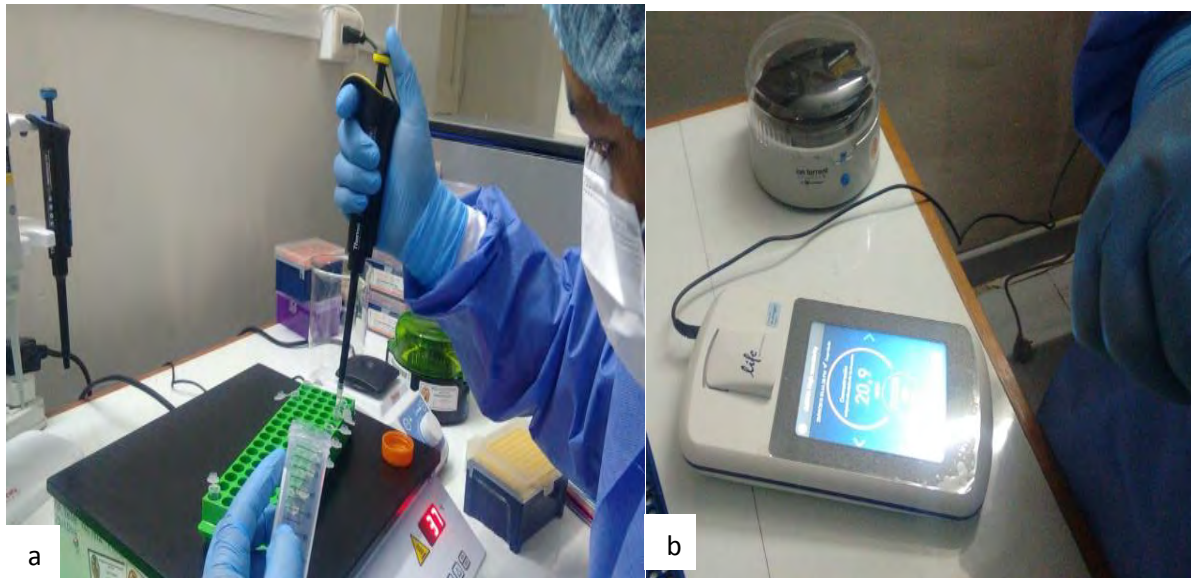
Se agregó 200 µL de tampón de elución se incubó por 2 minutos a temperatura ambiente se centrifugo por un minuto a 8,000 x g (10.000rpm). Se empleó el protocolo de Kit de purificación de ADN genómico Gene JET Scientific Thermo # K0721K0722 # Pub. N° MAN0012663 (Thermo Fisher Scientific Inc., WA, USA). La cuantificación de ADN se determinó mediante el protocolo Qubit® 2.0 Fluorometro, usando Qubit™ dsDNA HS Assay Kit (Invitroge™, Thermo Fisher Scientific Inc., WA, USA).

**Figura 5. Extracción de ADN.**



**Fuente:** proceso de extracción de ADN(a), muestras ya procesadas(b).

**Figura 6. Cuantificación de ADN, usando el equipo Qubit™ Fluorómetro.**



### **5.6. PREPARACIÓN, AMPLIFICACIÓN Y DISEÑO DE PRIMERS O INICIADOR POR PCR.**

Se utilizó la plataforma ION torrent S5 Ampliseq para la preparación de paneles de primers, a la vez con la plantilla del genoma completo de la alpaca, en Genbank online. Se empleó para la amplificación de las regiones codificantes diseñados con la plataforma Ion Ampliseq 6.0.1, Ion Torrent S5 New Generation (Lite Technologies, [www.ampliseq.com](http://www.ampliseq.com)). Con la concentración de 100 nm cada uno (Lite Technologies, Carlsbad, CA, EE. UU.). La cual fue desarrollado por la empresa thermo fisher.

**Tabla 2. Primers del gen *ASIP* en el genoma de la alpaca.**

ID de amplicones	Primers Forward 5' a 3'	Primers Reverd 3' a 5'	Inicio del Amplicon	Final del amplicon	Tamaño (Pb)
<b>2093986</b>	AGCTCAAGGC CTGGAAAGTT TT	TCCGCTGGTC TATGTCTCAA GAT	10007454	10007818	364
<b>2093987</b>	GCAAGCTACA CCTGCTAGAG AT	TTCCCAGGCA GAGATGAGAG AGAGT	10005091	10005390	299
<b>2093985</b>	CACAGCAATG GATCCTGGTA TCA	GTAGGGTCCA GCCCAAAGAA ACAC	10008854	10009228	374
<b>2093988</b>	CCTTTTTCTGC GAGGAAACAC TG	GCCAGTTAGG TTTGATGAGG ATAGAG	10005314	10005542	228
<b>Total</b>					1125

**5.7. PREPARACIÓN DE LIBRERÍAS Y SECUENCIACIÓN.**

Para seguir los procedimientos de las tres etapas utilizamos el protocolo comercial, en plataforma de secuenciación masiva ION S5™ (Ion AmpliSeq™ Library Kit 2.0 y Ion 520™ & Ion 530™ Kit – OT2). Protocolo Ion AmpliSeq™ Library Kit 2.0.

**5.8. PREPARACIÓN Y REACCIONES DE AMPLIFICACIÓN DE ADN.**

Se utilizó un panel de ADN con 2 grupos de cebadores, para ello se dará inicio en la siguiente tabla, protocolos que se sigue en cada equipo que integran la secuenciación masiva de nueva generación ION S5 (Thermo Fisher) para la obtención de resultados.

**Tabla 3. Inicio para la amplificación de ADN (reactivos).**

<b>Panel de primers</b>	
<b>Procedimiento</b>	<b>Volumen</b>
5X Ion AmpliSeq™ HiFi Mix (tapa roja)	4 µL
2X Ion AmpliSeq™ Grupo de iniciadores	10 µL
DNA (1–100 ng)	≤6 µL
Agua libre de nucleasas	Hasta 20 µL

**Tabla 4. Amplificación del ADN: segundo grupo de cebadores (reactivos).**

<b>Componente</b>	<b>Volumen</b>
2X 2-Panel de primers	
5X Ion AmpliSeq™ HiFi Mix (tapa roja)	5 µL
Preparación de DNA (2–100 ng), o directa DNA	≤7.5 µL
Agua libre de nucleasas	to 12.5 µL
5X2- Panel de primers	
5X Ion AmpliSeq™ HiFi Mix (tapa roja)	4.5 µL
Preparación de DNA (2–100 ng)	≤13.5 µL
Agua libre de nucleasas	Hasta 18 µL

**Tabla 5. Proceso de amplificación de regiones en el termociclador.**

<b>Periodo</b>	<b>Etapa</b>	<b>Temperatura</b>	<b>Tiempo</b>
Primero, segundo y tercer periodo	Activación de enzimas	99°C	2 minutos
	Desnaturalización	99°C	15 segundos
	Alineamiento, reconocimiento y extensión	60°C	8 minutos
mantenimiento		10°C	Se puede guardar

**Tabla 6. Proceso de digestión y fragmentación de amplicones.**

Temperatura	Tiempo
50°C	10 minutos
55°C	10 minutos
60°C	20 minutos
10°C	Almacenamiento hasta por una hora

**Tabla 7. Ligación de adaptadores a los amplicones con Ion Code para generar librerías (reactivos).**

Orden	Componentes	Volumen
1	Solución de cambio (tapa amarilla) Adaptadores de IonCode™	4 µL
2	Mezcla de adaptadores de código de barras (código de barra para las bibliotecas- diluido Ion Xpress) adaptadores Ion AmpliSeq™ (tapón verde, para las bibliotecas no Código de barras)	2 µL
3	DNA Ligasa (tapa azul)	2 µL
-	Volumen total	30 µL

**Tabla 8. Ligación de adaptadores, Ion Code y amplicones en termociclador.**

Temperatura	Tiempo
22°C	30 minutos
68°C	5 minutos
72°C	5 minutos
10°C	Mantenimiento hasta por 24 horas



Durante el proceso de preparación de librerías, se realizó la primera purificación y lavado de librerías por medio de unas series de reacciones como muestra el protocolo en las tablas anteriores (protocolo preestablecido por la empresa Thermo Fisher):

1. Se centrifugó la placa para recoger el contenido en el fondo de los pocillos.
2. Se retiró con delicadeza el sello de la placa y se añadió 45  $\mu\text{L}$  (of Agencourt™ AMPure™ XP Reagent) a cada biblioteca. Se mezcló la suspensión de perlas con el ADN a fondo.
3. Se incubó por 5 minutos a temperatura ambiente y luego se colocó la placa en un bastidor magnético como el DynaMag™ Side Magnet, nuevamente se incubó por 2 minutos hasta que la solución se aclare. Cuidadosamente se retiró el sobrenadante sin alterar el pellet.
4. Se añadió etanol al 70% y luego se mueve la placa de imán para lavar las perlas. Y se retiró cuidadosamente el sobrenadante sin alterar el pellet (Figura 7).
5. Se repitió el paso número 4 para un segundo lavado.
6. Se aseguró que no quede restos de etanol al retirar de los tubos, secar al aire por 5 minutos

Prosiguiendo con el protocolo se realiza la cuantificación de biblioteca amplificada utilizando el qubit-fluorometro, después de cuantificar, se determinó el factor de dilución que da lugar a una concentración de 100Pm, que es adecuado para la preparación de la plantilla utilizando un kit de plantilla Ion.

**Figura 7. Purificación de librerías usando perlas imantadas.**



Para la amplificación de bibliotecas se retiró la biblioteca purificada del imán de placa, para luego añadir 50  $\mu\text{L}$  de (platinum™ PCR super Mix Hifi) y 2  $\mu\text{L}$  de (Library amplification primer Mix) a cada sedimento de perla. Para luego sellar realizar vórtice y centrifugado. Nuevamente a la placa

de imán por 2 minutos, se transfirió 50 µL de sobrenadantes a un nuevo tubo sin tocar el pellet seguidamente llevamos al termociclador. En este periodo hay posibilidad de realizar un punto de parada para almacenar las muestras a -20°C.

**Tabla 9. Proceso de amplificación de biblioteca en el termociclador.**

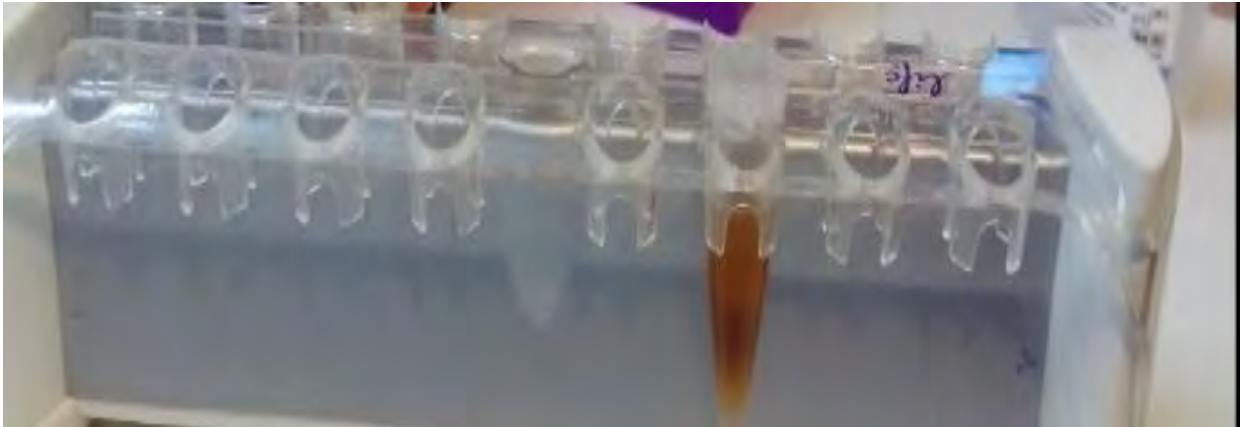
Periodo	Temperatura	Tiempo
Mantenimiento	98°C	2 minutos
5 ciclos	98°C	15 segundos
	64°C	1 minutos
Mantenimiento	10°C	Mantenimiento

En el proceso de purificación de bibliotecas en la primera fase se agregó a cada muestra 25 µL reactivo (Agencourt™ AMPure™ XP) mezcla bien, para luego incubar por 5 minutos y colocar al iman (DynaMag) por 5 minutos hasta que se despeje la muestras, trasferimos el sobrenadante a otros nuevos tubos sin alterar los pellets (el sobrenadante contiene amplicones deseados).

La segunda fase de lavado y purificación se utilizó el sobrenadante y se añadió 60 µL (Agencourt™ AMPure™ XP) incubamos por 5 minutos para luego colocar al imán por 3 minutos hasta que se despeje la solución desechamos el sobrenadante si alterar los pellets.

Se añadieron 150 µL de etanol al 70% a cada pocillo, luego se mueve la placa de lado a lado, se retiró el sobrenadante y repetimos un segundo lavado con etanol eliminando por completo las gotas de etanol dejamos que secar de 2-5 minutos. Siguiendo con el protocolo se agregó 50 µL de (low TE) para dispersar las perlas imantadas realizamos vórtice se incubó por 2 minutos y nuevamente en el Dinamax y trasladando el sobrenadante a nuevos tubos máximo recoberi de 1.5 ml, se analizó el sobrenadante con Qubit™ Fluorometro.

**Figura 8. Obtención de librería purificado.**



Se utilizó el equipo OneTouch-2 donde se insertó la placa de amplificación IonTouch™ cerramos el bloque de calor, luego se colocó el inyector desechable, botella de aceite (450ml), solución de recuperación y proseguimos a vaciar el contenedor de residuos para luego volver a colocar al equipo.

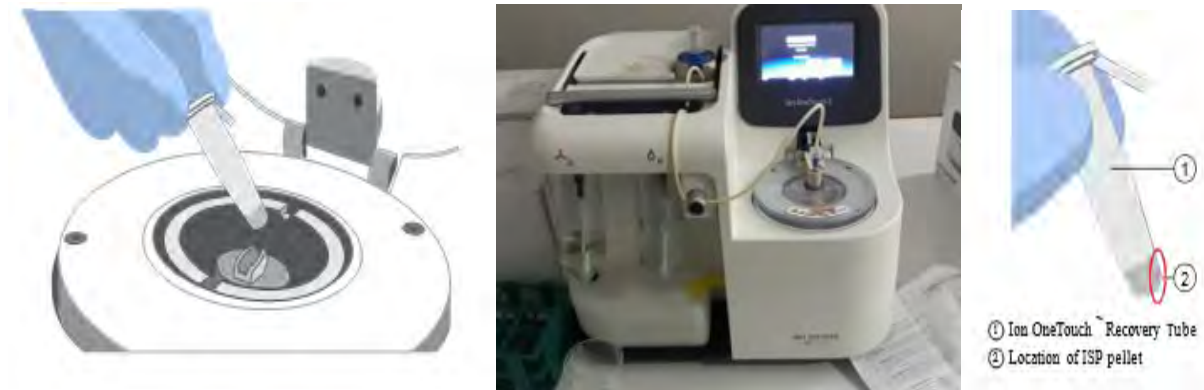
Para la preparación se llegó a diluir de 6-8  $\mu\text{L}$  de biblioteca con agua libre de nucleasa, se homogeniza y centrifuga y se agregó los siguientes componentes que indica (tab 10).

**Tabla 10. Reactivos para la preparación de librerías con fragmento de ADN (reactivo).**

Orden	Reactivo	Color	Volumen
1	Agua libre de nucleasas	—	80 $\mu\text{L}$
2	Ion S5™ mezcla de ezimas	Marrón	120 $\mu\text{L}$
3	Partículas de esferas ionicas (Ion Sphere™ Pat)	Negro	100 $\mu\text{L}$
4	Biblioteca diluida	—	100 $\mu\text{L}$
—	Total volumen (mezcla de reactivos)	—	2400 $\mu\text{L}$

Como resultado se obtuvo amplificación masiva por medio del equipo Ion One Touch 2™ con ayuda de microesferas (Ion Sphere™ Particles) donde creamos millones de reacciones idénticas por medio del PCR de emulsión.

**Figura 9. Amplificación por medio de emulsión en el equipo Ion One Touch 2TM.**



Luego se prosiguió con la purificación de la hebra de ADN duplicada usando el equipo Ion One Touch ES utilizando soluciones para los lavados de perlas enriquecidas.

**Tabla 11. Enriquecimiento de partículas de iones de esferas (ISPs) reactivos.**

Numero de pocillo	Cantidad de reactivo
1	Muestra de ISP (100 $\mu$ L; preparada en el paso 1 de este procedimiento)
2	130 $\mu$ L de ( Dynabeads™ MyOne™ Streptavidin), las perlas se volvieron a suspender en MyOne- perlas de captura (preparado en el lavado y resuspension las Dynabeads)
3	300 $\mu$ L de Ion OneTouch™ ES solución de lavado
4	300 $\mu$ L de Ion OneTouch™ ES solución de lavado
5	300 $\mu$ L de Ion OneTouch™ ES solución de lavado
6	Vacío
7	300 $\mu$ L de solución Melt-Off recién preparada (preparación de la solución de fusión)
8	Vacío

Siguiendo con la secuenciación de primer a perlas enriquecidas se centrifugo y retiramos cuidadosamente el sobrenadante sin alterar el sedimento, se agrega reactivos como (Iones S5-

cebador de secuencia y Ion S5- tampón de hibridación). Luego se programó en el termociclador, después del ciclo se añadió Ion S5-polimerasa.

**Figura 10. Programación del termociclador térmico.**



## 5.9. SECUENCIACION.

Para la secuenciación se cargó el producto final con la solución Sphere™ Particles y ADN Polimerasa al chip modelo 520 con micropocillos, sitio donde se produce la secuenciación masiva, se transfiere el chip al secuenciador hasta la ejecución completa.

**Figura 11. Microchip Ion 520 de secuenciación.**



**Figura 12. Ejecución y carga de micro chip 520 en el secuenciador.**



#### **5.10. ANÁLISIS DE VARIANTES.**

Para realizar el análisis, primero se ejecutó el llamador de variantes de Ion Torrent (TSVC) con las primeras 168 muestras, esas variantes se combinaron utilizando el kit de herramientas de análisis del genoma (GATK) y el archivo VCF resultante tenía 17 variantes. A continuación, se volvió a ejecutar la llamada de variantes con las 49 muestras restantes utilizando la lista de variantes generada en la primera pasada como puntos calientes para las variantes. Este procedimiento permite detectar no sólo las variantes sino también los puntos con el alelo de referencia. La matriz final con todas las muestras tiene 12 variantes. Las secuencias se alinearon utilizando el software Bosque 2.0.2 (Ramírez-Flandes & Ulloa, 2008).

#### **5.11. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.**

Se analizó utilizando el software Variant Caller de Ion Torrent (TSVC), analizándose variantes que nos proporciona resultados para cada animal con características fenotípicas propias y permitió encontrar polimorfismos en cada muestra evaluada. Los archivos se procesaron con el software plink v 1.90b4. Se analizaron las variantes con p-valor ajustado por el método de Holm's y el software Scan Prosite para el análisis de codificación del gen *ASIP* en alpacas.

El análisis de la secuencia aminoacídica mediante el programa Scan Prosite (<http://www.expasy.ch/tools/scanprosite>) reveló la existencia de un perfil de dominio AGUTÍ (Figura 13) que presenta 40 residuos de longitud, hay diez residuos de cisteína en el dominio C-terminal que forman una red de cinco enlaces disulfuro. El dominio C-terminal agutí contiene una hoja  $\beta$  antiparalela de tres cadenas, donde las dos últimas cadenas forman una horquilla. La región de giro de la horquilla presenta un triplete de residuos (Arg-Phe-Phe) que se sabe que son esenciales para la unión del receptor de melanocortina (McNullty *et al.*, 2005)

**Figura 13. Secuencia aminoacídica del gen ASIP de alpaca, observándose el perfil de dominio AGUTÍ (zona oscura).**

```
MDVSRLLLATLLVCLCFLTACSHLAPDEKPRDEGSLRSNSSKNLLDFPSVSIVALNKKSKKISRK  
EAEKKKSSSKKKAPTCKKVAQPRPLLPAVCVATCDSCKPPAPACCDPCAFCQCRFFRSVCSCRV  
LSPTC
```

#### 5.12. CARACTERIZACION DE LA SECUENCIACION.

Para determinar frecuencias observadas y esperadas, así como valor de Chi- cuadrado utilizado como prueba de bondad de ajuste y p- valor se utilizó el programa estadístico R Studio lo podemos observar en (Anexo 5).

#### 5.13. DIVERSIDAD GENÉTICA.

La determinación de diversidad haplotípica ( $H_d$ ) y diversidad nucleotídica ( $\pi$ ) (Nei, 1987) fueron determinados usando el programa DNAsp (Rozas *et al.*, 2003). Los sitios de información parsimoniosa y sitios conservados de las secuencias fueron obtenidos a través del programa MEGA (Tamura *et al.*, 2007).

Al analizar las muestras obtenidas se encontró una diversidad haplotípica de 0.592946, una diversidad nucleotídica  $\pi$  de 0.005484.

La diversidad nucleotídica encontrada en el gen *ASIP* fue elevada ( $\pi= 0.005484$ ) comparando con la llama ( $\pi= 0.00191$ ) (Daverio, 2014) y perro ( $\pi=0.00057$ ) (Wang *et al.*, 2013) indicado por el mayor número de polimorfismos encontrados en las alpacas.

#### **5.14. FRECUENCIAS ALÉLICAS Y GENOTÍPICAS.**

Se determinaron las frecuencias alélicas, esto se determina contando cuántas veces aparece un alelo en la población y dividiendo esta cifra entre el número total de copias y genotípicas para cada uno de los polimorfismos encontrados en el presente estudio, dichas frecuencias se detallan en la tabla 12.



**Tabla 12. Frecuencias alélicas y genotípicas de los polimorfismos encontrados en el gen ASIP en alpacas.**

Polimorfismo	Color	Alelo 1	Alelo 2	Frecuencia homocigota p <sup>2</sup>	Frecuencia heterocigota 2pq	Frecuencia homocigota q <sup>2</sup>	FAM
A102G	Blanco	0.91	0.09	0.8281	0.1638	0.0081	0.09
	Negro	0.64	0.36	0.4096	0.4608	0.1296	0.36
	Café	0.72	0.28	0.5184	0.1296	0.0784	0.28
+G1197A	Blanco	0.92	0.08	0.8473	0.1464	0.0063	0.08
	Negro	0.63	0.37	0.3928	0.4679	0.1393	0.37
	Café	0.67	0.33	0.4530	0.4401	0.1069	0.33
+T34C	Blanco	0.07	0.93	0.0046	0.1271	0.8682	0.07
	Negro	0.32	0.68	0.1024	0.4352	0.4624	0.32
	Café	0.56	0.44	0.3123	0.4931	0.1946	0.44
+A56C	Blanco	0.90	0.10	0.8059	0.1836	0.0105	0.10
	Negro	0.53	0.47	0.2857	0.4976	0.2167	0.47
	Café	0.6	0.4	0.36	0.48	0.16	0.4
+T2097C	Blanco	0.02	0.98	0.0003	0.0343	0.9654	0.02
	Negro	0	1	0	0	1	0
	Café	0	1	0	0	1	0
+A2105G	Blanco	0.09	0.91	0.0073	0.1559	0.8368	0.09
	Negro	0.57	0.43	0.3195	0.4915	0.1890	0.43
	Café	0.22	0.78	0.0486	0.3439	0.6075	0.22
A291C	Blanco	0.11	0.89	0.0111	0.1884	0.8005	0.11
	Negro	0.55	0.45	0.2975	0.4959	0.2066	0.45
	Café	0.37	0.63	0.1386	0.4674	0.3940	0.37
T292C	Blanco	0.10	0.90	0.0109	0.1866	0.0825	0.10
	Negro	0.40	0.60	0.1634	0.4817	0.3549	0.40
	Café	0.24	0.76	0.0567	0.3628	0.5805	0.24
324Del 325_381	Blanco	0.65	0.35	0.4195	0.4564	0.1214	0.35
	Negro	0.53	0.47	0.2778	0.4985	0.2237	0.47
	Café	0.43	0.57	0.1827	0.4895	0.3278	0.43
+T10C	Blanco	0.10	0.90	0.0095	0.1755	0.8150	0.10
	Negro	0.55	0.45	0.2991	0.4956	0.2053	0.45
	Café	0.34	0.66	0.1159	0.4491	0.4350	0.34
+37InsA	Blanco	0.03	0.97	0.0009	0.0571	0.9420	0.03
	Negro	0	1	0	0	1	0
	Café	0	1	0	0	1	0
+A38G	Blanco	0.86	0.14	0.7361	0.2437	0.0202	0.14
	Negro	0.58	0.42	0.3421	0.4856	0.1723	0.42
	Café	0.70	0.30	0.4868	0.4218	0.0914	0.30

**Fuente:** FAM: Frecuencia del alelo menor.

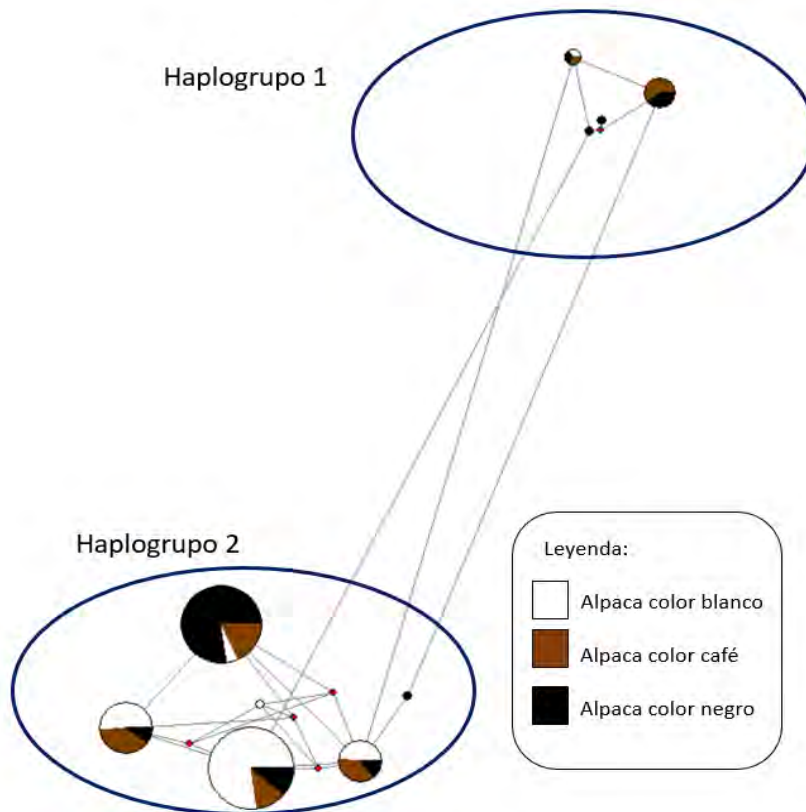
### 5.15. ANÁLISIS FILOGENÉTICO.

La red de haplotipos o network para las secuencias obtenidas fue realizada con el programa Network join10.2.0 (Bandelt *et al.*, 1999) empleando el algoritmo median joining para encontrar relaciones filogenéticas entre las secuencias. Esto permite poder visualizar de forma gráfica haplotipos en las poblaciones analizadas y patrones demográficos.

### 5.16. DETERMINACIÓN DE HAPLOTIPOS Y ESTUDIO DEL GEN EN LOS TRES FENOTIPOS DE COLOR.

Analizando los polimorfismos presentes en la región codificante se encontraron 10 haplotipos, teniendo frecuencias distintas y a las cuales se denominó haplotipo 1 al 10. La definición de cada uno de ellos se reporta en la tabla 13. A su vez se identificaron dos haplogrupos bien marcados haciendo el análisis filogenético de las alpacas analizadas (Figura 14), siendo 5 haplotipos de baja frecuencia.

**Figura 14. Red de haplotipos utilizando el programa Network v.10.2.0.0.**



**Fuente:** Las frecuencias de cada haplotipo se correlacionan con el tamaño de los círculos y la diferencia de colores indica el color de las alpacas que se analizó.

**Tabla 13. Definición de haplotipos.**

Nombre	Posición de las variantes			
	102	291	292	Delección
Haplotipo 1 (75)	G	C	C	No
Haplotipo 2 (67)	G	A	T	No
Haplotipo 3 (29)	G	C	T	No
Haplotipo 4 (21)	G	A	C	No
Haplotipo 5 (10)	A	A	C	Si
Haplotipo 6 (3)	G	A	C	Si
Haplotipo 7 (1)	N	C	T	Si
Haplotipo 8 (1)	G	C	C	Si
Haplotipo 9 (1)	A	A	C	No
Haplotipo 10 (1)	G	A	N	No

**Fuente:** ( ): Número de animales por grupo.

El haplotipo 1 y 2 representaron el 35.89% y el 32.06% del total de haplotipos agrupado, los haplotipos 5, 6, 7 y 8 fueron aquellos donde se encontraba la delección de 57 pares de bases, siendo el más frecuente dentro de este grupo el haplotipo 5 y los menores los haplotipos 6 y 7 con frecuencias muy bajas (0.48%)

### **5.17. PRUEBAS DE MODELO NEUTRO**

La teoría de mutación neutral propuesta por (Kimura, 1968) señala que la mayoría de los cambios son fijados por deriva genética y son adaptativamente neutros, es decir, que no van a ser afectados por la selección natural (Ramírez-Olaya, 2016). Para determinar la hipótesis de mutación neutra se utilizan métodos como el test de Tajima (Tajima, 1989) y Fs de Fu (Fu, 1997).

### **5.18. TEST DE TAJIMA**

Descrito por Tajima en 1989, permite comparar de forma estimada el número de sitios segregantes, el cual se ve afectado por el tamaño de la muestra como por los alelos de menor frecuencia, y el de promedio del número de diferencias a pares, que es afectado en mayor medida por los alelos más frecuentes y es independiente por el tamaño muestral (Chirinos, 2012). Un valor de  $D'Tajima > 0$  sugiere un reciente cuello de botella poblacional o alguna forma de

selección balanceada, mientras que un valor de  $D'Tajima < 0$  sugiere expansión poblacional o selección purificante (Chirinos, 2012).

Así mismo, se obtuvo un valor de Tajima (usando la prueba que lleva este nombre) con un valor negativo de -0.170722, lo cual indicaría una expansión poblacional o selección purificante de los animales analizados.

### **5.19. TEST FS DE FU**

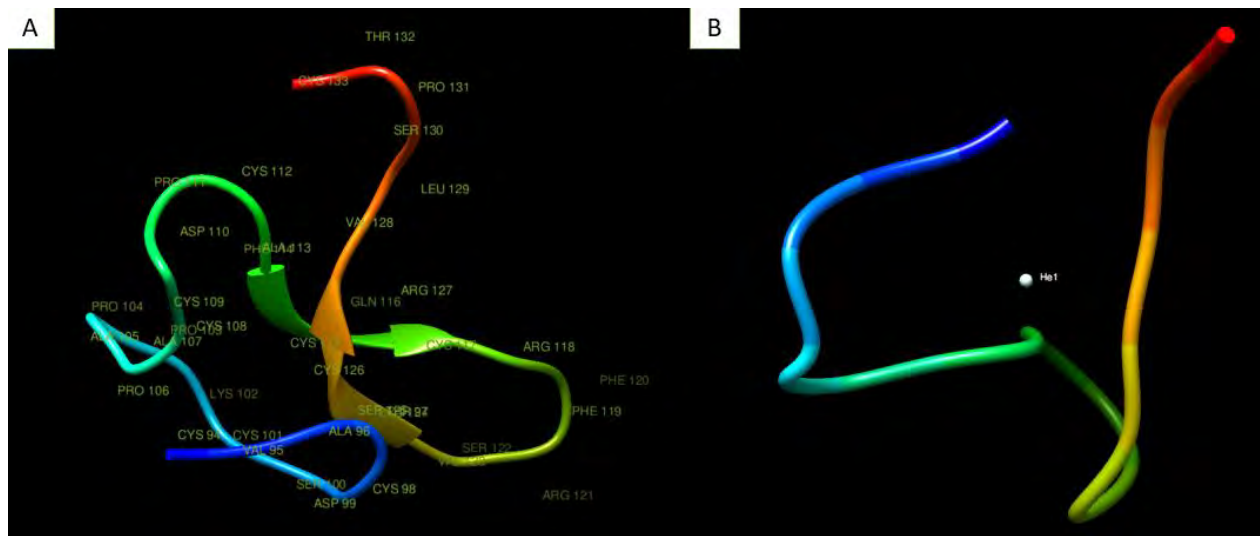
Yun- Xin Fu (1997) propone un modelo estadístico basado en el modelo de sitios infinitos de mutación. Un valor negativo de  $F_s$  indicaría un exceso en el número de alelos, lo cual se daría en una reciente expansión poblacional. En caso de un valor positivo indicaría un déficit de alelos ocasionado por una selección de sobredominancia o un cuello de botella sufrido en la población. El uso de este test permite ser más sensitivo que el test de Tajima en caso de recientes expansiones poblacionales. El programa DnaSP (Rozas *et al.*, 2003) fue utilizado para determinar ambos tests. Corroborado por un test más sensitivo (Test  $F_s$  de Fu) el cual da un valor de -0.241335, usando para ello el programa DnaSP 6.0.

En el caso del test de Tajima y de  $F_s$  de Fu muestran valores negativos ( -0.170722 y -0.241335 respectivamente) lo cual indicaría una expansión poblacional o selección purificante a favor de colores definidos.

### **5.20. EFECTO DE LA DELECCIÓN.**

Para determinar como la delección de 57 pares de bases afecta la estructura de la proteína se utilizó el programa Swiss model (Waterhouse *et al.*, 2018) para la creación de la modelación de la proteína a partir de la información de secuencias publicadas en la red y el programa UCSF Chimera (Pettersen *et al.* 2004) para determinar una mejor visualización de la proteína.

**Figura 15. Estructura proteica del gen *ASIP*.**



**Fuente:** A proteína completa con 133 aminoácidos. B: proteína con delección de 19 aminoácidos que claramente afecta.

## VI. RESULTADOS

### 6.1. AMPLIFICACION Y SECUENCIACION DE LA REGION CODIFICANTE Y REGIONES INTRONICAS PARCIALES DEL GEN *ASIP* EN ALPACAS.

Un total de 1125 pares de bases (pb) que corresponden al 100% de la región codificante, así como regiones parciales intrónicas y región 3'UTR fueron amplificados, las cuales abarcan el exón 2 con 160 pb y de donde se origina la región codificante del gen *ASIP*, el exón 3 con 65 pb, el exón 4 con 177 pb, 31 pb del intrón 1, 220 pb del intrón 2, 326 pb del intrón 3 y 82 pb de la región 3'UTR, utilizando cuatro pares de cebadores o primers que se detallaron la Tabla 2 y que pueden visualizarse gráficamente en el anexo 6 para tener una mejor idea de los fragmentos amplificados y la región que abarcan. El gen fue secuenciado en un total de 217 alpacas, este gen se encuentra en el cromosoma 19 según referencia VicPac3

### 6.2. BÚSQUEDA DE POLIMORFISMOS EN LA REGIÓN CODIFICANTE DEL GEN *ASIP*.

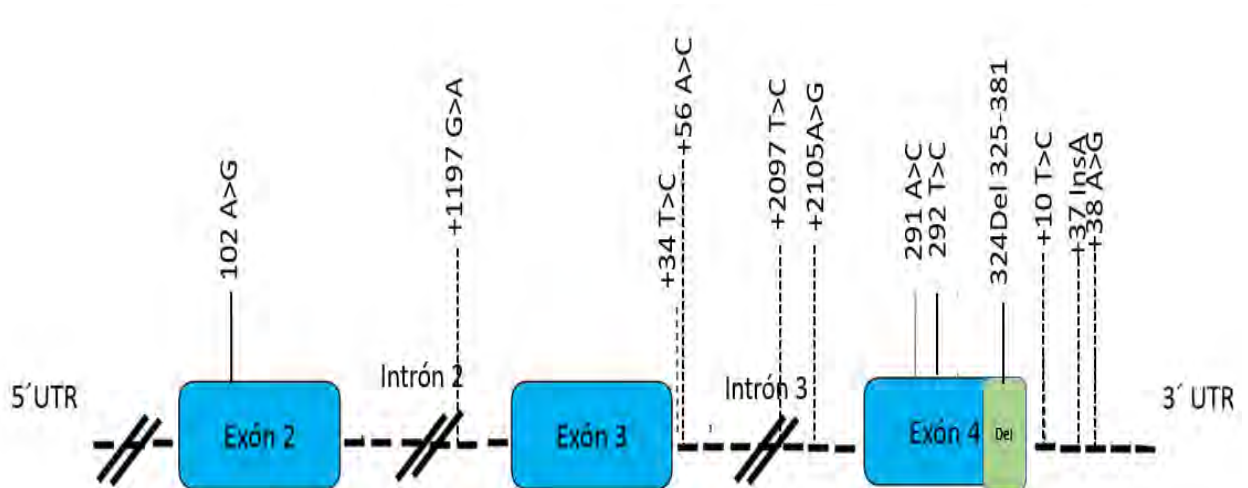
Al realizar el alineamiento de las secuencias obtenidas del gen *ASIP* en alpacas se hallaron doce polimorfismos SNP (Tabla 14), donde tres se encontraron en la región codificante y sólo uno de ellos fue de tipo no sinónimo, cinco se encontraron a nivel de regiones intrónicas y dos de ellos en la región 3'UTR. Así mismo se encontraron dos InDels (Inserciones - deleciones), una de ellas es una deleción de 57 pares de bases en la región codificante y la otra es una inserción de un nucleótido en la región 3'UTR (Tabla 14).

**Tabla 14. Polimorfismos identificados en el gen *ASIP*.**

Polimorfismo	Localización	Cambio aminoacídico	Dominio proteico
c. 102A>G	Exón 2	Sinónimo	
c. +1197G>A	Intrón 2	NA	-
c. +34T>C	Intrón 3	NA	-
c.+56A>C	Intrón 3	NA	-
c.+2097T>C	Intrón 3	NA	-
c.+2105A>G	Intrón 3	NA	-
c.291A>C	Exón 4	Sinónimo	Agutí
c.292T>C	Exón 4	p. Arg98Cist	Agutí
c.324Del325_381	Exón 4	p.109DelCDPCAFCQCHFFRSVCSCRV	Agutí
c.+10T>C	3'UTR	NA	-
c.+37InsA	3'UTR	NA	-
c.+38A>G	3'UTR	NA	-

**Fuente:** c. Región codificante, UTR. Región no traducida, NA. No presenta cambio.

Figura 16. Organización estructural del gen *ASIP* en alpacas blancas y de color.



**Fuente:** La delección del Exón 4 está sombreada en color verde.

### 6.3. ANÁLISIS DE ASOCIACIÓN ENTRE LOS POLIMORFISMOS PRESENTES EN EL GEN *ASIP* Y FENOTIPOS DE COLOR.

De los 12 polimorfismos presentes en el gen *ASIP*, ocho de estos resultaron significativos con el color de pelaje, siendo dos de ellos sinónimos (c.102A>G y c.291A>C), uno de ellos no sinónimo (c. 292T>C), tres ubicados en regiones intrónicas (c.1197A>G, c.+34C>T y c.+2105A>G), dos ubicados en la región 3'UTR (c.+10T>C y c.+38A>G) y la delección de 57 pares de bases ubicada en la región codificante (c. 324Del 325-381) los resultados se detallan en la tabla 15.

**Tabla 15. Polimorfismos identificados en este estudio, que fueron significativos para el color de pelaje blanco, café y negro en alpacas.**

Polimorfismo	Alelo	Fenotipo en alpacas			P-valor (%)
		Blanco	Negro	Café	
c.102A>G	A/A	71	22	24	0,0000001519
	A/G	15	42	18	
	G/G	0	7	4	
c.+1197G>A (I2)	G/G	74	23	26	0,00001048
	A/G	14	43	18	
	A/A	0	5	8	
c.+34C>T (I3)	C/C	0	17	8	0,00005071
	T/C	12	42	16	
	T/T	76	9	26	
c.+2105A>G (I3)	A/A	0	16	6	0,00008986
	A/G	15	46	3	
	G/G	73	7	25	
c.291A>C	A/A	0	15	9	0,00008986
	A/C	16	42	17	
	C/C	60	9	21	
c.292T>C	T/T	1	4	1	0,00008986
	T/C	13	30	18	
	C/C	58	13	23	
c. 324Del 325- 381	No Del	27	11	10	0.02381
	Heterocigota	60	56	24	
	Homocigota	1	7	7	
c.+10T>C 3'UTR	T/T	0	15	8	0,00005071
	T/C	14	40	16	
	C/C	58	9	23	
c.+38A>G 3'UTR	A/A	65	14	21	0,0000004946
	A/G	21	34	18	
	G/G	2	5	4	



## VII. DISCUSIÓN

El presente estudio ha permitido la caracterización del gen *ASIP* en alpacas, donde no sólo nos centramos en encontrar polimorfismos en el exón 4 y región codificante, también tratamos de abarcar región intrónica y así como regiones no traducidas, gracias a ello se reportó un total de 12 polimorfismos, cuatro de ellos no publicados anteriormente y encontrados en regiones intrónicas como en el intrón 2 (+G1197A), en el intrón 3 (+T2097C, +A2105G) y a nivel de la región 3'UTR (+37InsA).

La eliminación / inserción / sustitución de aminoácidos en regiones puede originar alteración importante y significativas en los genes (McNulty *et al.*, 2005) y la región codificante puede presentar variantes, siendo más importante los SNPs de tipo no sinónimo porque ocasionan un cambio aminoacídico pudiendo afectar la estructura de la proteína y que como vemos en el trabajo, las regiones intrónicas también son importantes de estudiar porque indican que podría regular el nivel de expresión de la proteína que dé como característica de un color de pelaje determinado.

El total de polimorfismos encontrados fueron mencionados en el anexo 4, donde 8 de estos demuestran tener asociación con el color del pelaje, principalmente 3 de ellos (c.A102G ubicado en la región codificante del exón 2, c.+A38G ubicado en la región 3'UTR y c.+G1197A ubicado en el intrón 2) lo encontramos en la tabla 15.

Hasta la fecha era un polimorfismo encontrado en el exón 2 y dos en el exón 4 con asociación al pelaje negro en alpacas (Feeley, *et al.* 2011, Chandramohan, *et al.* 2013, Pallotti *et al.* 2020) y en llamas (Daverio, 2014), enfocándose en la delección de 57 pb en la posición 324 y en el cambio de Timina por Citocina en la posición 291. En caso de Feeley *et al.*, (2011) encontraron en 15 alpacas dos polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) no sinónimos en el exón 4: c.C292T, que se predijo que causaría una sustitución de ARG/CIS en el codón 98 y c.G353A, así como una delección de 57 pb en el exón 4. Además, dos mutaciones sinónimas que identificaron c.G102A en el exón 2 (p.G34) y c.C291A en el exón 4 (p.T291) habiendo una fuerte asociación en estado homocigoto para el color negro. Kerns *et al.*, (2004) encontraron en perros pastores alemanes negros la sustitución de Arg a Cys en el codón 96 e indican que esta sustitución es la responsable de la herencia recesiva en pelo negro.

Chen *et al.*, (1996) obtuvo tres alelos distintos que son relacionadas con la herencia recesiva para la pigmentación negra y estos alelos fueron distribuidos en forma aleatoria en animales de pelaje negro y este fenotipo es fuertemente ligado a la heterogeneidad alélica.

Asimismo, en el estudio realizado todas las alpacas negras genotipificadas eran heterocigotas para el alelo *ASIP* mutado, concordando con resultados hallados en alpacas por (Pallotti *et al.*

2020), donde el porcentaje de variantes heterocigotos es de un 75% y homocigotos un 35% en nuestra población de alpacas negras.

Cabe señalar que los genotipos negros se caracterizan por una alta heterogeneidad alélica recesiva en alpacas (Pallotti *et al.*, 2020), de esta forma. Chandramohan *et al.*, (2013) caracteriza al gen *ASIP* e identifica tres mutaciones potencialmente involucradas con el fenotipo eumelánicos y feomelánicos en el exón-4 que alberga las mutaciones g.3836C>T, g.3896G>A y g.3866\_3923del57. revelando dos genotipos para animales negros, sin embargo. Feeley *et al.*, (2011) acota que estas mutaciones no explican todos los casos de negro ni toda la variación fenotípica que es posible en *ASIP*.

Nuestros resultados en 84 alpacas de color blanco indican alpacas homocigotas dominantes de forma mayoritaria para los 8 polimorfismos con un bajo porcentaje de heterocigotas (puede verse en la tabla 12 con los datos de cada uno de los polimorfismos y sus frecuencias) y que incluye los polimorfismos de las regiones intrónicas y 3'UTR.

En las 59 alpacas de color café analizadas se muestra similitud con respecto al color blanco, siendo los polimorfismos mayoritariamente de tipo homocigoto dominante y heterocigoto, pero sin marcada diferencia entre ellos.

En la evaluación de 74 alpacas de color negro se observa el doble de animales heterocigotos que homocigotos dominantes.

Pallotti *et al.*, 2020 observa que en 25 alpacas negras polimorfismos en estado heterocigoto para el alelo *ASIP*, sugiriendo que estas mutaciones conducen a una pérdida completa de la función de la proteína traducida. El indica también que, en alpacas de pelaje negro, el gen *ASIP* no funcional hace que la proteína no se una correctamente al receptor *MC1R*, lo que impide el inicio de la síntesis de feomelanina en los melanocitos. A su vez, el *MC1R* funcional se une al  $\alpha$ -*MSH* permitiendo la síntesis de los eumelanosomas maduros redondos y ovalados (gránulos de pigmento negro) que muestran estrías transversales que confieren el color negro al tallo del cabello (Renieri *et al.* 1991). Esto implica que el vellón negro se caracteriza por la presencia casi exclusiva del pigmento eumelanina, mientras que en el fenotipo blanco se produce una cantidad muy pequeña de feomelanina (Renieri *et al.* 1991, Cecchi *et al.* 2011) debido a la falta de alelos *ASIP* funcionales. Feeley *et al.*, (2011) menciona, que en caso de alpacas de color negro los polimorfismos son de tipo homocigoto para que se exprese un color negro en el vellón, pero trabajando con una cantidad pequeña de animales (94 animales entre color negro café y blanco).

Los resultados que encontramos en este trabajo tienen más relación con los encontrados por Pallotti *et al.*, (2020) teniendo como respaldo la mayor cantidad de animales muestreados y que permite tener un panorama más amplio de la segregación de los polimorfismos en el gen *ASIP*.

Con respecto a la delección de 57pb en el Exón 4 del gen *ASIP* con posible pérdida de función. En alpacas Feeley *et al.*, (2011), Chandramohan *et al.*, (2013) y Pallotti *et al.*, (2020) encontraron que esta delección tiene asociación con el color de pelaje, principalmente en alpacas de color negro y café, donde dicha delección fue de tipo homocigoto para que se exprese el color negro. Daverio, (2014) también encuentra que esta delección está presente en llamas de color.

En nuestro caso, a pesar de tener asociación con el color de pelaje, encontramos que a diferencia de los trabajos realizados anteriormente, para alpacas de las tres tonalidades en su mayoría eran de tipo heterocigoto, y en caso de alpacas con delección de ambas cadenas de ADN 17 animales presentaban esta delección en estado homocigoto, siendo uno de ellos de color blanco, pero que por esta delección se forman claramente dos haplogrupos bien marcados entre las alpacas analizadas (Figura 14) con diez haplotipos que tendrían un papel importante en el color de vellón de alpacas, teniendo claro que las regiones intrónicas también cumplen con un papel regulador.

Se ha demostrado evidencias que el gen *ASIP* y *MC1R* son los genes clave que controlan el color en las alpacas. Hay evidencia de cuatro alelos de *ASIP* y dos alelos de *MC1R* (Munyard, 2013). Concluyéndose que el vellón blanco entero es dominante sobre vellón LF, blanco manchado, café claro, café dominante sobre el negro (Gallegos, 2012). Nuestro trabajo aporta a los ya cuatro alelos reportados, cuatro alelos más y su función en el papel del gen *ASIP* en el color de pelaje de las alpacas.

## VIII. CONCLUSIONES

- Al analizar y caracterizar la secuencia del gen *ASIP* y su variabilidad genética para los colores en alpacas estudiadas de color blanco, café y negro, nos brindó resultados en las regiones del exón e intrón y 3'UTR en los tres fenotipos estudiados y no en región no traducida 5'UTR.
- Se observó una fuerte asociación del gen *ASIP* con el color de pelaje en alpacas de color blanco en su mayoría en estado homocigoto dominante y negro en estado heterocigoto, pero no en alpacas de color café donde no se aprecia una clara relación entre animales heterocigotos y homocigotos dominantes.
- Ocho de los 12 polimorfismos identificados en el gen *ASIP* presentan asociación con el color blanco, café y negro en alpacas, donde también observó una mayor variabilidad en alpacas estudiadas que se encuentra en expansión poblacional o selección purificante.

## RECOMENDACIONES

- Realizar trabajos específicos con las asociaciones de genes implicados en las tonalidades ya descritas en otras especies en posteriores trabajos de investigación, para ver una mayor expresión de color individual con la asociación de genes para una característica fenotípica.
- Identificar asociaciones directas de empalmes, deleciones, regiones codificantes y otros aspectos genéticos en sus secuencias en la expresión genética de cada individuo con una gama de genes secuenciados. Para obtener variantes polimórficas SNPs en un pool de genes relacionadas al color de fibra.

## BIBLIOGRAFÍA

- ADAMEYKO, I., LALLEMEND, F., AQUINO, J., PEREIRA, J., P., T., MULLER, T., & USOSKIN, D. (2009). Schwann Cell Precursors from Nerve Innervation Are a Cellular Origin of Melanocytes in Skin. *Cell*, 139(2), 366-379. doi:10.1016/j.cell.2009.07.049
- ALMATHEN, F., ELBIR, H., BAHBAHANI, H., MWACHARO, J., & HANOTTE, O. (2018). Polymorphisms in MC1R and ASIP genes are associated with coat color variation in the arabian camel. *Journal of Heredity*, 109(6), 700 - 706. Obtenido de <https://academic.oup.com/jhered/article/109/6/700/5035183>
- ALSHANBARI, F., CASTANEDA, C., JURAS, R., HILLHOUSE, A., MENDOZA, M., GUTIERREZ, G., . . . RAUDSEPP, T. (2019). Comparative FISH-mapping of MC1R, ASIP and TYRP1 in New and Old World camelids and association analysis with coat color phenotypes in the dromedary (*Camelus dromedarius*). *Frontiers in Genetics*, 10, 340. doi:10.3389/fgene.2019.00340
- ANELLO, M. (2019). *Estudio molecular de genes candidatos para el color de capa de llamas (Lama glama)*. Argentina: Universidad Nacional de La Plata. Obtenido de <http://sedici.unlp.edu.ar/handle/10915/87617>
- BADAJOS, E., GARCIA, W., & PEZO, D. (2009). Descripción histológica del complejo folicular piloso en crías de alpacas. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú.*, 20(2), 154-164. Obtenido de [http://www.scielo.org.pe/scielo.php?pid=S1609-91172009000200002&script=sci\\_arttext](http://www.scielo.org.pe/scielo.php?pid=S1609-91172009000200002&script=sci_arttext)
- BANDELT, H., FORSTER, P., & ROHL, A. (1999). Redes de unión mediana para inferir filogenias intraespecíficas. *Biología molecular y evolución*, 16(1), 37-48. doi:10.1093/oxfordjournals.molbev.a026036
- BATHRACHALAM, C., NOCELLI, C., PAZZAGLIA, I., PALLOTTI, S., PADICONI, D., LA TERZA, A., & RENIERI, C. (2019). Interaction between ASIP and MC1R in Black and Brown Alpaca. *Universitätsverlag Göttingen*, 163. Obtenido de [https://library.oapen.org/bitstream/handle/20.500.12657/37234/gerken\\_advances.pdf?sequence=1#page=165](https://library.oapen.org/bitstream/handle/20.500.12657/37234/gerken_advances.pdf?sequence=1#page=165)
- BULTMAN, S., MICHAUD, E., & WOYCHIK, R. (1992). Molecular characterization of the mouse agouti locus. *Cell*, 71(7), 1195-1204. Obtenido de [https://www.cell.com/cell/pdf/S0092-8674\(05\)80067-4.pdf](https://www.cell.com/cell/pdf/S0092-8674(05)80067-4.pdf)

- BUSTINZA, V. (2001). *La Alpaca, conocimiento del gran potencial andino* (Vol. I). Puno - Perú: Universidad Nacional del Altiplano. Obtenido de [https://scholar.google.es/scholar?hl=es&as\\_sdt=0%2C5&q=La+Alpaca%2C+conocimiento+del+gran+potencial+andino&btnG=](https://scholar.google.es/scholar?hl=es&as_sdt=0%2C5&q=La+Alpaca%2C+conocimiento+del+gran+potencial+andino&btnG=)
- CABALLERO, W., & FLORES, A. (2004). La Sierra: Primera Prioridad para salir del subdesarrollo agrario. *CONCYTEC*, 272. Obtenido de <http://www.sidalc.net/cgi-bin/wxis.exe/?IsisScript=inperupe.xis&method=post&formato=2&cantidad=1&expresion=mfn=007282>
- CANDILLE, S., KAELIN, C., CATTANACH, B., YU, B., THOMPSON, D., NIX, M., & BARSH, G. (2007). A  $\beta$ -defensin mutation causes black coat color in domestic dogs. *Science*, 318(5855), 1418 - 1423. doi:10.1126/science.1147880
- CARPIO, F. (2017). La cadena de valor para optimizar la producción de fibra de Alpaca en la empresa Sais Sollocota Ltda. N° 5-Perú. *Comuni@cción*, 8(2), 125-136. Obtenido de <http://www.scielo.org.pe/pdf/comunica/v8n2/a06v8n2.pdf>
- CASTRIGNANO, F., ANTONINI, M., MISITA, S., CRISTOFANELLI, S., & RENIERI, C. (2001). Secuencia de la Proteína-1 relacionado a la tirosina (Trp-1) en Alpacas. *DESCO*, 67-79.
- CECCHI, T., COZZALI, C., PASSAMONTI, P., CECCARELLI, P., PUCCIARELLI, F., GARGIULO, A., & RENIERI, C. (2004). Melanins and Melanosomes From Llama (*Lama glama* L.). *Pigment cell research*, 17(3), 307 - 311. doi:10.1111/j.1600-0749.2004.00139.x
- CECCHI, T., VALBONESI, A., PASSAMONTI, P., GONZALES, M., ANTONINI, M., & RENIERI, C. (2011). Variación cuantitativa de melaninas en alpaca (*Lama pacos* L.). *Diario italiano de ciencia animal*, 10(3), e30. doi:10.4081/ijas.2011.e30
- CHAMBILLA, V. (1983). Estructura histológica de la piel de llama (*Lama glama*). *Universidad Nacional del Altiplano*, Tesis de Médico Veterinario y Zootecnista - Puno. Obtenido de <http://www.sidalc.net/cgi-bin/wxis.exe/?IsisScript=cidab.xis&method=post&formato=2&cantidad=1&expresion=mfn=000438>
- CHANDRAMOHAN, B., RENIERI, C., LA MANNA, V., & LA TERZA, A. (2013). The agouti gene in black and brown alpaca. *Symposium on South American Camelids and other Fibre Animals*. Obtenido de [https://www.researchgate.net/profile/Chandramohan\\_Bathrachalam2/publication/301](https://www.researchgate.net/profile/Chandramohan_Bathrachalam2/publication/301)

764165\_The\_agouti\_gene\_in\_black\_and\_brown\_alpaca/links/5726035a08ae586b21e044f5.pdf

- CHEN, Y., DUHL, D., & BARSH, G. (1996). Opposite orientations of an inverted duplication and allelic variation at the mouse agouti locus. *Genetics*, 144(1), 265-277. Obtenido de [genetics0265.pdf?token=AQECAHi208BE49Ooan9kKhW\\_Ercy7Dm3ZL\\_9Cf3qfKAc485ysgAAAatgwgglUBgkqhkiG9w0BBwagggLFMIICwQIBADCCAROgCSqGSIb3DQEHAATAeBglghkgBZQMEAS4wEQQMOB2fduGrjs072dJJAQEgIIci5a-iVx-Y6nFEI2KQ-bO96YjPFmx8fCquMBB6Z2TOnalkc2Cp9cgrLo7RWNngpbjLarB2p\\_Frql0n](https://genetics.0265.pdf?token=AQECAHi208BE49Ooan9kKhW_Ercy7Dm3ZL_9Cf3qfKAc485ysgAAAatgwgglUBgkqhkiG9w0BBwagggLFMIICwQIBADCCAROgCSqGSIb3DQEHAATAeBglghkgBZQMEAS4wEQQMOB2fduGrjs072dJJAQEgIIci5a-iVx-Y6nFEI2KQ-bO96YjPFmx8fCquMBB6Z2TOnalkc2Cp9cgrLo7RWNngpbjLarB2p_Frql0n)
- CIESLAK, M., REISSMANN, M., HOFREITER, M., & LUDWIG, A. (2011). Colours of domestication. *Biological Reviews*, 86(4), 885-899. doi:10.1111/j.1469-185X.2011.00177.x
- CRANSBERG, R., & MUNYARD, K. (2011). Polymorphisms detected in the tyrosinase and matp (slc45a2) genes did not explain coat colour dilution in a sample of Alpaca (Vicugna pacos). *Small ruminant research*, 95(2 -3), 92 - 96. doi:10.1016/j.smallrumres.2010.10.004
- DAVERIO, M. (2014). *Caracterización de genes vinculados al crecimiento y al color de capa en la Llama (Lama glama)*. Universidad Nacional de La Plata. Doctoral dissertation, Universidad Nacional de La Plata. doi:10.35537/10915/40703
- DAVERIO, M., ALCOELA-ERSINGER, V., ANELLO, M., VIDAL-RIOJA, L., & DI ROCCO, F. (2019). PCR-RFLP Method for Testing ASIP EXON 4 Mutations in Llamas. En L. M. Gutiérrez, *Advances in Fibre Production Science in South American Camelids and other Fibre Animals* (pág. 71). Obtenido de [https://library.oapen.org/bitstream/handle/20.500.12657/37234/gerken\\_advances.pdf?sequence=1#page=73](https://library.oapen.org/bitstream/handle/20.500.12657/37234/gerken_advances.pdf?sequence=1#page=73)
- DAVERIO, M., RIGALT, F., ROMERO, S., VIDAL-RIOJA, L., & DI ROCCO, F. (2016). Polymorphisms in MC1R and ASIP genes and their association with coat color phenotypes in llamas (Lama glama). *Small Ruminant Research*, 144, 83 - 89. doi:10.1016/j.smallrumres.2016.08.003
- DUNNER, S. (2014). Genética de la coloración de capas y mucosas en el perro y en el gato. *Revista veterinaria profesional de animales de compañía*. Obtenido de [https://www.ucm.es/data/cont/docs/345-2019-04-08-capas\\_perros\\_gatos.pdf](https://www.ucm.es/data/cont/docs/345-2019-04-08-capas_perros_gatos.pdf)



- ESCALANTE, A., BARBOLLA, L., RAMIREZ-BARAHONA, S., & EGUIARTE, L. (2014). The study of biodiversity in the era of massive sequencing. *Mexicana de Biodiversidad*, 85(4), 1249-1264. doi:10.7550/rmb.43498
- FEELEY, N., BOTTOMLEY, S., & MUNYARD, K. (2011). Three novel mutations in ASIP associated with black fibre in alpacas (*Vicugna pacos*). *The Journal of Agricultural Science*, 149(4), 529-538. doi:10.1017/S0021859610001231
- FERNANDEZ, A. (2015). *Busqueda de genes relacionados a la síntesis de la fibra y marcadores SSR en los ESTs de piel de alpaca Vicugna pacos*. Tesis, Universidad Nacional Mayor de San Marcos Facultad de Ciencias Biológicas E.A.P. de Genética y Biotecnología, Lima - Peru. Obtenido de <http://cybertesis.unmsm.edu.pe/handle/cybertesis/4473>
- FITZPATRICK, T., MIYAMOTO, M., & ISHIKAWA, K. (1967). The evolution of concepts of melanin biology. *Archives of dermatology*, 96(3), 305-323. doi:10.1001/archderm.1967.01610030083015
- FRANK, E., HICK, M., GAUNA, C., LAMAS, H., RENIERI, C., & ANTONINI, M. (2006). Phenotypic and genetic description of fibre traits in South American domestic camelids (llamas and alpacas). *Small Ruminant Research*, 61(2 - 3), 113 - 129. doi:10.1016/j.smallrumres.2005.07.003
- FU, Y. (1997). Pruebas estadísticas de neutralidad de mutaciones frente al crecimiento poblacional, autostop y selección de antecedentes. *Genética*, 147(2), 915-925. doi:10.1093/genetics/147.2.915
- FUJITA, R. (2007). Genómica y su aplicación en producción animal. *XX Reunion ALPA, XXX Reunion APPA - Cusco - Perú*, 15, 67 - 68. Obtenido de <http://repositorio.usmp.edu.pe/handle/usmp/1520>
- FUJITA, R. (2008). Necesidad de la Genómica en el Mejoramiento de Camélidos en el Perú. *revista de divulgación científica*, 20-23. Obtenido de <http://repositorio.usmp.edu.pe/handle/usmp/1519>
- GALLEGOS, R. (2012). Expresión fenotípica del color de fibra en Alpacas (*Vicugna pacos* Linneaus) en el Altiplano Peruano. *Universidad Nacional del Altiplano - UNA - Puno - Tesis*, 7.
- GENERAL, C. (2015). *Finalmente esperamos que este Libro virtual cumpla con su rol primordial como es el de informar a los investigadores, estudiantes, productores y sectores involucrados, para que puedan visualizar los avances y problemas que les*

- permitan diseñar congruente. Obtenido de [https://www.researchgate.net/profile/Marcelino\\_Aranibar2/publication/286625910\\_VII\\_WORLD\\_CONGRESS\\_ON\\_SOUTH\\_AMERICAN\\_CAMELIDS\\_-\\_2015/links/566caf6508aea0892c4fe4d2.pdf](https://www.researchgate.net/profile/Marcelino_Aranibar2/publication/286625910_VII_WORLD_CONGRESS_ON_SOUTH_AMERICAN_CAMELIDS_-_2015/links/566caf6508aea0892c4fe4d2.pdf)
- GONZALES, J., & PUMASUPA, N. (2005). *Censo poblacional de camélidos domésticos y características básicas de su crianza en la provincia de Antabamba-Apurímac*. Antabamba-Apurímac: MARENASS - Proyecto Manejo de Recursos Naturales Sierra Sur. Obtenido de <http://infoalpacas.com.pe/wp-content/uploads/2016/03/BVCI0001109.pdf>
- GRIFFIN, H., & GRIFFIN, A. (1993). Secuencia ADN. *Bioquímica aplicada y biotecnología*, 38(1), 147-159. doi:10.1007/BF02916418
- HART, K., BAKER, S., SKERRIT, J., & VERCOE, P. (2003). The gene for white fleece in alpacas is homologous to AWT, the gene for white fleece in sheep. *Gene Expresión*, 82 - 85. Obtenido de <http://www.aaabg.org/livestocklibrary/2003/82-85.pdf>
- HEARING, V. (2011). Determination of Melanin Synthetic Pathways. *J Invest Dermatol*, 131(3), E8-E11. doi:10.1038/skinbio.2011.4
- HOEKSTRA, H. (2006). Genetics, development and evolution of adaptive pigmentation in vertebrates. *Heredity*, 97(3), 222-234. Obtenido de <https://www.nature.com/articles/6800861>
- HUANCA, T., APAZA, N., & GONZÁLES, M. (2007). Experiencia del INIA en el fortalecimiento del banco de germoplasma de camélidos domésticos. *Arch. Latinoam. Prod. Anim*, 15(1), 186 - 194. Obtenido de <http://www.bioline.org.br/pdf?la07051>
- KERNS, J., NEWTON, J., BERRYERE, T., RUBIN, E., CHENG, J., SCHMUTZ, S., & BARSH, G. (Octubre de 2004). Characterization of the dog Agouti gene and a nonagoutimutation in German Shepherd Dogs. *Mammalian Genome*, 15(10), 798-808. doi:10.1007 / s00335-004-2377-1
- KIMURA, M. (1968). Variabilidad genética mantenida en una población finita debido a la producción mutacional de isoalelos neutros y casi neutros. *Investigación genética*, 11(3), 247-270. doi:10.1017/S0016672300011459
- KINGSLEY, E., MANCEAU, M., WILEY, C., & HOEKSTRA, H. (2009). Melanism in *Peromyscus* is caused by independent mutations in Agouti. *PLoS Uno*, 4(7), e6435. doi:10.1371/journal.pone.0006435

- KLUNGLAND, H., & VAGE, D. (2003). Pigmentary Switches in Domestic Animal Species. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 994(1), 331 - 338. doi:10.1111/j.1749-6632.2003.tb03197.x
- LAI, W., HU, M., ZHU, W., YU, F., BAI, C., ZHANG, J., & YAN, S. (2009). A 4-bp deletion in the ASIP gene is associated with the recessive black coat colour in domestic guinea pigs (*Cavia porcellus*). *Animal genetics*, 50(2), 190-191. doi:10.1111/age.12766
- LANCERA, M. (1993). *Laboratorio de Investigación y Análisis del Cuero y Efluentes*. Ecuador: AMBATO.
- LIN, J., & FISHER, D. (2007). Melanocyte biology and skin pigmentation. *Nature*, 445(7130), 843-850. doi:10.1038/nature05660
- MANTOUX, F. O. (2003). Fisiología del sistema pigmentario - EMC-Dermatología. *ELSEVIER*, 37(3), 1-10.
- MARIN, J., RIVERA, R., VARAS, V., CORTES, J., AGAPITO, A., CHERO, A., . . . OROZCO-TERWENGEL, P. (2018). Genetic variation in coat colour genes MC1R and ASIP provides insights into domestication and management of south American camelids. *Frontiers in genetics*, 9, 487. doi:10.3389/fgene.2018.00487
- MARMOL, V., & BEERMANN, F. (1996). Tyrosinase and related proteins in mammalian pigmentation. *FEBS Letters*(381), 165-168. doi:10.1016/0014-5793(96)00109-3
- MARTÍN, F., TRUJILLO, E., & PAREDES, F. (2008). Técnicas para el diagnóstico molecular de enfermedades hereditarias. *Unidad de Investigación. Hospital Universitario Nuestra Señora de Candelaria. Santa Cruz de Tenerife. - BOL PEDIATR*, 48, 235 - 241.
- MCGILL, G., HORSTMANN, M., WIDLUND, H., DU, J., MOTYCKOVA, G., NISHIMURA, E., . . . FISHER, D. (2002). Bcl2 Regulation by the Melanocyte Master Regulator Mitf Modulates Lineage Survival and Melanoma Cell Viability. *Cell*, 109(6), 707-718. doi:10.1016/S0092-8674(02)00762-6
- MCNULTY, J., JACKSON, P., THOMPSON, D., CHAI, B., GANTZ, I., BARSH, G., . . . MILLHAUSER, G. (2005). Structures of the agouti signaling protein. *Journal of molecular biology*, 346(4), 1059 - 1070. doi:10.1016/j.jmb.2004.12.030
- MENDOZA, M. (2019). *Localización de genes y marcadores moleculares de alpaca (Vicugna pacos) mediante la técnica de hibridación fluorescente in situ (FISH)*. Tesis de Maestría, Lima. Obtenido de <http://repositorio.lamolina.edu.pe/handle/UNALM/4153>

- MENDOZA, M., RAUDSEPP, T., ALSHANBARI, F., GUTIERREZ, G., & PONCE DE LEON, F. (2019). Chromosomal localization of candidate genes for fiber growth and color in alpaca (*Vicugna pacos*). *Frontiers in genetics*, *10*, 583. doi:10.3389/fgene.2019.00583
- MERUANE, M., & ROJAS, M. (2012). Desarrollo de la Piel y sus Anexos en Vertebrados. *Int. J. Morphol*, *30*(4), 1422-1433. doi:10.4067/S0717-95022012000400025
- MILLER, W., GRIFFIN, C., & CAMPBELL, K. (2012). *La dermatología de pequeños animales de Muller y Kirk*. Elsevier Health Sciences. Obtenido de [https://books.google.es/books?hl=es&lr=&id=urlFOAYWjxkC&oi=fnd&pg=PP1&dq=Small+Animal+Dermatology+&ots=Eptq7eIRjB&sig=IBJ-G\\_iV-pYrfqUVRNLKVva0paw#v=onepage&q=Small%20Animal%20Dermatology&f=false](https://books.google.es/books?hl=es&lr=&id=urlFOAYWjxkC&oi=fnd&pg=PP1&dq=Small+Animal+Dermatology+&ots=Eptq7eIRjB&sig=IBJ-G_iV-pYrfqUVRNLKVva0paw#v=onepage&q=Small%20Animal%20Dermatology&f=false)
- MILTENBERGER., WAKAMATSU, K., ITO, S., WOYCHIK, R., RUSSELL, L., & MICHAUD, E. (2002). Molecular and phenotypic analysis of 25 recessive, homozygous-viable alleles at the mouse agouti locus. *Genetics*, *160*(2), 659-674. Obtenido de <https://www.genetics.org/content/160/2/659.short>
- MUNYARD, K. (2013). *Inheritance of white colour in Alpacas: Identifying the genes involved*. Rural Industries Research and Development Corporation. Obtenido de <https://espace.curtin.edu.au/handle/20.500.11937/42262>
- NEI, M. (1987). Molecular evolutionary genetics. *Columbia University Press*.
- NORRIS, B., & WHAN, V. (2008). A gene duplication affecting expression of the ovine ASIP gene is responsible for white and black sheep. *Genome research*, *18*(8), 1282-1293. doi:10.1101/gr.072090.107
- OCHOA, F. (2006). Biología de los melanocitos. *Revista de la Asociación Colombiana de Dermatología y Cirugía Dermatológica*, *14*(4), 371-380. Obtenido de <https://revista.asocolderma.org.co/index.php/asocolderma/article/view/497>
- PACHECO, D., GONZALES, M., & ALGREDO, I. (2015). De la Secuenciación a la Aceleración Hardware de los Programas de Alineación de ADN, una Revisión Integral. *Revista mexicana de ingeniería biomédica*, *36*(3), 259-277. doi:10.17488/RMIB.36.3.6
- PALLOTTI, S., CHANDRAMOHAN, B., PEDICONI, D., NOCELLI, C., LA TERZA, A., & RENIERI, C. (2020). Interaction between the melanocortin 1 receptor (MC1R) and agouti signalling protein genes (ASIP), and their association with black and brown coat colour phenotypes in peruvian alpaca. *Journal of Animal Science*, *19*(1), 1518-1522. doi:10.1080/1828051X.2020.1850216

- PARRA, E. (2011). Evolución de la pigmentación en la especie humana. *Piel*, 26(2), 66-79. doi:10.1016/j.piel.2010.09.020
- PETTERSEN, E., GODDARD, T., HUANG, C., COUCH, G., GREENBLATT, D., MENG, E., & FERRIN, T. (2004). UCSF Chimera: un sistema de visualización para investigación y análisis exploratorios. *Revista de química computacional*, 25(13), 1605-1612. doi:10.1002/jcc.20084
- PINTADO, M. (2013). Resultados Cenagro 2012: modernización agraria y vinculación al mercado. *La Revista Agraria*(153), 2-3. Obtenido de [http://propuestaciudadana.org.pe/sites/default/files/sala\\_lectura/archivos/La%20revista%20agraria%20153.pdf](http://propuestaciudadana.org.pe/sites/default/files/sala_lectura/archivos/La%20revista%20agraria%20153.pdf)
- PORTOCARRERO, J., & POTEROS, A. (2009). Función reguladora del sistema nervioso en la pigmentación de la carpa dorada: Un experimento de la ingeniería genética. *Lámpsakos*(2), 8-12. doi:10.21501/21454086.767
- POWELL, A., MOSS, M., TREE, L., ROEDER, B., CARLETON, C., CAMPBELL, E., & KOOYMAN, D. (2008). Characterization of the effect of Melanocortin 1 Receptor, a member of the hair color genetic locus, in alpaca (*Lama pacos*) fleece color differentiation. *Small Ruminant Research*, 79(2-3), 183 - 187. doi:10.1016/j.smallrumres.2008.07.025
- QUISPE, C., RODRIGUEZ, T., IÑIGUEZ, L., & MULLER, J. (2009). Producción de fibra de alpaca, llama, vicuña y guanaco en Sudamérica. *Animal Genetic Resources/Resources génétiques animales/Recursos genéticos animales*, 45, 1 - 14. doi:10.1017/S1014233909990277
- RAMÍRES-OLAYA, L. (2016). El juego de aprender y enseñar el concepto estructurante evolución biológica. *Bio-grafía*, 9(10), 29-42. doi:10.17227/20271034.vol.9num.17bio-grafia29.42
- RAMIRÉZ-FLANDES, S., & ULLOA, O. (2008). Bosque: integrated phylogenetic analysis software. *Bioinformatics*, 24(21), 2539-2541. doi:10.1093/bioinformatics/btn466
- RENIERI, C., TRABALZA, M., MARTINO, G., & GIORDANO, G. (1991). Investigación preliminar sobre la calidad del pelaje y sobre el color del pelaje en sujetos pigmentados de alpacas (*Lama glama pacos*PF). *Investigación de células de pigmento*, 905-914.
- RIEDER, S., TAOURIT, S., MARIAT, D., LANGLOIS, B., & GUERIN, G. (2001). Mutations in the agouti (ASIP), the extension (MC1R), and the brown (TYRP1) loci and their

- association to coat color phenotypes in horses (*Equus caballus*). *Mammalian genome*, 12(6), 450-455. doi:10.1007/s003350020017
- ROYO, L., ALVAREZ, I., ARRANZ, J., FERNANDEZ, I., RODRÍGUEZ, A., PÉREZ-PARDAL, L., & GOYACHE, F. (2008). Differences in the expression of the ASIP gene are involved in the recessive black coat colour pattern in sheep: evidence from the rare Xalda sheep breed. *Animal Genetics*, 39(3), 290-293. doi:10.1111 / j.1365-2052.2008.01712.x
- ROZAS, J., SÁNCHEZ-DELBARRIO, J., MESSEGUER, X., & ROZAS, R. (2003). DnaSP, análisis de polimorfismos de ADN por coalescencia y otros métodos. *Bioinformática*, 19(18), 2496-2497. doi:10.1093/bioinformatics/btg359
- RUIZ DE CASTILLA MARÍN, M. (2004). *Genética y Mejoramiento de animales domésticos*. Tesis, Universidad Nacional Agraria La Molina (UNALM)Biblioteca Agrícola Nacional, (BAN), Perú, Lima. Obtenido de <http://www.sidalc.net/cgi-bin/wxis.exe/?IsisScript=inperupe.xis&method=post&formato=2&cantidad=1&expresion=mfn=009457>
- SASAMORI, S., WIEWEL, A., THOMSON, V., KOBAYASHI, M., NAKATA, K., & SUZUKI, H. (2017). Potential causative mutation for melanism in rats identified in the agouti signaling protein gene (*Asip*) of the *Rattus rattus* species complex on Okinawa Island, Japan. *Zoological science*, 34(6), 513-522. doi:10.2108/zs170027
- SHANG, S., YU, Y., ZHAO, Y., DANG, W., ZHANG, J., QIN, X., . . . MORE, s. (2019). Synergy between MC1R and ASIP for coat color in horses (*Equus caballus*). *Journal of animal science*, 97(4), 1578-1585. doi:10.1093/jas/skz071
- SIMON, J., PELES, D., WAKAMATSU, K., & ITO, S. (2009). Current challenges in understanding melanogenesis: bridging chemistry, biological control, morphology, and function. *Pigment Cell & Melanoma Research*, 22(5), 563-759. doi:10.1111/j.1755-148X.2009.00610.x
- SLOMINSKI, A., TOBIN, D., SHIBAHARA, S., & WORTSMAN, J. (2004). Melanin Pigmentation in Mammalian Skin and Its Hormonal Regulation. *Physiol Rev*, 84, 1228-2004. doi:10.1152/physrev.00044.2003
- SPONENBERG, D. (2004). *La genética de colores en alpacas*. Puno - Perú: Universidad Nacional del Altiplano de Puno.
- SUGUMARAN, M. (1991). Molecular mechanisms for mammalian melanogenesis. *FEBS Letters - Elsevier*, 295(1,2), 233-239. doi:10.1016/0014-5793(91)81431-7

- SULAIMON, S., & KITCHELL, B. (2003). The biology of melanocytes. *Veterinary dermatology*, 14(2), 57-65. Obtenido de <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1046/j.1365-3164.2003.00327.x>
- SUZUKI, H. (2013). Evolutionary and phylogeographic views on Mc1r and Asip variation in mammals. *Genes & genetic systems*, 88(3), 155-164. doi:doi.org/10.1266/ggs.88.155
- TAJIMA, F. (1989). Método estadístico para probar la hipótesis de mutación neutra por polimorfismo de ADN. *Genética*, 123(3), 585-595. doi:10.1093/genetics/123.3.585
- TAMURA, K., DUDLEY, J., NEI, M., & KUMAR, S. (2007). MEGA4: software de análisis de genética evolutiva molecular (MEGA) versión 4.0. *Biología molecular y evolución*, 24(8), 1596-1599. doi:10.1093/molbev/msm092
- TORRES DE JASAU, J., VÉLEZ, V., ZAGARRA, J., & DÍAZ, G. (2007). Caracterización de la histología de la piel de alpaca. *Appa - Alpa*, 1-8. Obtenido de [https://scholar.google.es/scholar?hl=es&as\\_sdt=0%2C5&q=Caracterizaci%C3%B3n+de+la+histolog%C3%ADa+de+la+piel+de+alpaca&btnG=](https://scholar.google.es/scholar?hl=es&as_sdt=0%2C5&q=Caracterizaci%C3%B3n+de+la+histolog%C3%ADa+de+la+piel+de+alpaca&btnG=)
- TREJO, W. (1986). *Estudio de la correlación fenotípica entre diámetro de fibra y la escala de colores en alpacas Huacaya (No. SF401 T7-T)*. Tesis, Universidad Nacional Agraria La Molina, Lima (Peru). Facultad de Zootecnia., Lima - Perú. Obtenido de <http://www.sidalc.net/cgi-bin/wxis.exe/?IsisScript=tesispe.xis&method=post&formato=2&cantidad=1&expresion=mfn=007276>
- VALBONESI, A., APAZA, N., LA MANNA, V., GONZALES, M., HUANCA, T., & RENIERI, C. (2011). Inheritance of white, black and brown coat colours in alpaca (*Vicuna pacos* L.). *Small Ruminant Research*, 99(1), 16 - 19. doi:10.1016/j.smallrumres.2011.04.003
- WANG, H., LIU, X., & WANG, X. (2005). Estructura interna y gránulos de pigmento en fibras de alpaca de colores. *Fibras y polímeros.*, 6(3), 263-268. Obtenido de <https://link.springer.com/article/10.1007/BF02875652>
- WATERHOUSE, A., BERTONI, M., BIENERT, S., STUDER, G., TAURIELLO, G., GUMIENNY, R., . . . SCHWEDE, T. (2018). SWISS-MODEL: modelado por homología de estructuras y complejos proteicos. *Investigación de ácidos nucleicos*, 46(W1), W296-W303. doi:10.1093/nar/gky427
- YAJIMA, I., & LARUE, L. (2008). The location of heart melanocytes is specified and the level of pigmentation in the heart may correlate with coat color. *Pigment cell & melanoma research*, 21(4), 471-476. doi:10.1111 / j.1755-148X.2008.00483.x

## ANEXOS

**Anexo 1.** Alpacas de color blanco (identificación y extracción de muestra sanguínea por venopunción).



**Anexo 2.** Alpacas de color café (identificación y extracción de muestra sanguínea por venopunción).



**Anexo 3.** Alpacas de color negro (identificación y extracción de muestra sanguínea por venopunción).



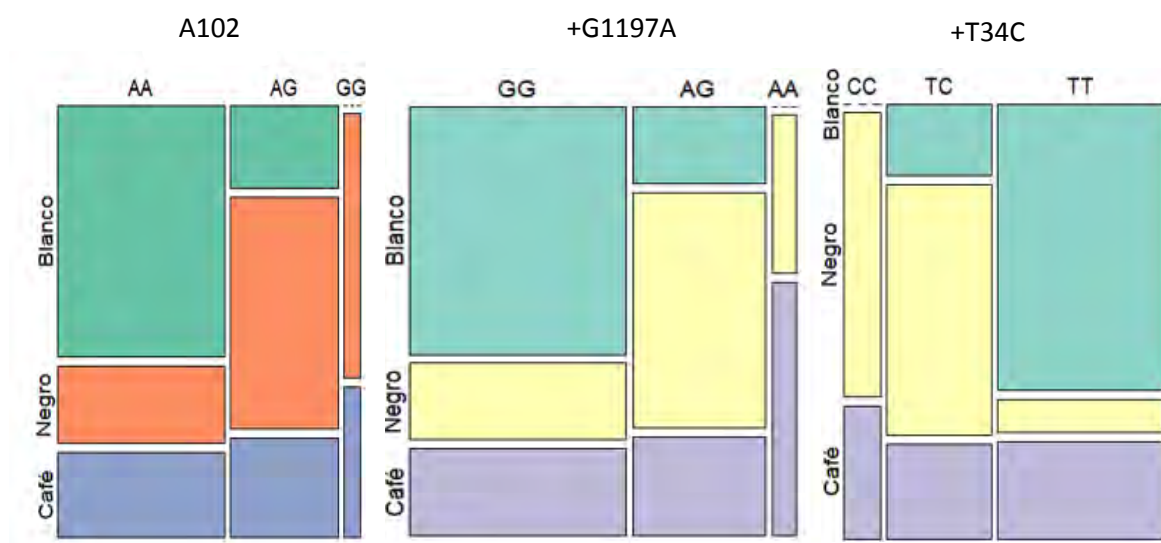


**Anexo 4.** Distribución de genotipos para los polimorfismos encontrados entre los diferentes fenotipos de color.

Polimorfismo	Alelo	Fenotipo en alpacas		
		Blanco	Negro	Café
c.102A>G	A/A	71	22	24
	A/G	15	42	18
	G/G	0	7	4
c.+1197G>A (I2)	G/G	74	23	26
	A/G	14	43	18
	A/A	0	5	8
c.+34C>T (I3)	C/C	0	17	8
	T/C	12	42	16
	T/T	76	9	26
c.+56A>C (I3)	A/A	70	14	20
	A/C	18	34	20
	C/C	0	10	10
c.+2097T>C (I3)	T/T	0	0	0
	C/T	1	0	0
	C/C	84	23	43
c.+2105A>G (I3)	A/A	0	16	6
	A/G	15	46	3
	G/G	73	7	25
c.291A>C	A/A	0	15	9
	A/C	16	42	17
	C/C	60	9	21
c.292T>C	T/T	1	4	1
	T/C	13	30	18
	C/C	58	13	23
c. 324Del 325-381	No Del	27	11	10
	Heterocigota	60	56	24
	Homocigota	1	7	7
c.+10T>C 3'UTR	T/T	0	15	8
	T/C	14	40	16
	C/C	58	9	23
c.+37InsA 3'UTR	Homocigota	1	0	0
	Heterocigota	3	0	0
c.+38A>G 3'UTR	No Del	81	21	39
	A/A	65	14	21
	A/G	21	34	18
	G/G	2	5	4

**Leyenda:** Del: Delección, UTR: Región no traducida, I2: Intrón 2, I3: Intrón 3.

**Anexo 5.** Determinación del total de polimorfismos analizados con prueba de bondad de ajuste de Chi- cuadrado.



ALELO	BLANCO		NEGRO		CAFE		Chi cuadrado	P- valor	Posición
	Fr Obs	Fr Esp	Fr Obs	Fr Esp	Fr Obs	Fr Esp			
<b>AA</b>	71	49.566	22	26.231	24	26.512	44.803	4.368e-09	A102G
<b>AG</b>	15	31.773	42	40.921	18	16.995			
<b>GG</b>	0	4.66	7	3.847	4	2.493			
<b>AA</b>	74	51.299	23	25.237	26	38.313	53.582	6.438e-11	+G1197A
<b>AG</b>	14	31.280	43	41.389	18	18.483			
<b>GG</b>	0	5.422	5	4.374	8	3.204			
<b>AA</b>	76	47.417	17	23.107	8	6.068	84.941	2.2e-16	+T34C
<b>AG</b>	12	29.903	42	36.641	16	16.990			
<b>GG</b>	0	10.680	9	8.252	26	26.941			

**Fuente:** Se observa tres de los polimorfismos más resaltantes donde se llega a visualizar en caso de alpacas blancas alelos homocigotos en su mayoría, en caso de alpacas negras se observa alelos heterocitos y en caso de alpacas cafes tanto homocigos como alelos heterocigos. Fr Obs: Frecuencia observada, Fr Esp: Frecuencia esperada. NoDel: Sin inserción, InsA: Inserción.



**ANEXO 8.** Alpacas de color blancos utilizados en el trabajo de investigación donde no se tomó en cuenta animales que no lograron amplificarse la deleción de 57 pares de bases ubicado en la posición 324.

Id animal	Raza	Posición	Cambio	Posición	Cambio	Posición	Cambio	Posición	Cambio	Posición	Cambio	Posición	Cambio	Posición	Cambio	Posición	Cambio	Posición	Cambio	Posición	Cambio	Posición	Cambio	Posición	Cambio		
106	Huacayo	3'UTR+38	AG	3' +37	No call	3' +10	No Call	324	Del/-	292	No Call	291	No Call	I3+2015	GG	I3+2097	No call	I3+56	AA	I3+34	CC	I2+1197	GG	102	GG	5'UTR-26	No call
107	Huacayo	3'UTR+38	No Call	3'+37	No call	3'+10	No Call	324	No Call	292	No Call	291	No Call	I3+2015	GG	I3+2097	No call	I3+56	No Call	I3+34	No Call	I2+1197	No Call	102	GG	5'UTR-26	No call
109	Huacayo	3'UTR+38	AG	3'+37	No call	3'+10	TC	324	Del/-	292	No Call	291	AC	I3+2015	No Call	I3+2097	No call	I3+56	AC	I3+34	TC	I2+1197	GA	102	No Call	5'UTR-26	No call
113	Suri	3'UTR+38	No Call	3'+37	No call	3'+10	CC	324	No Call	292	CC	291	CC	I3+2015	GG	I3+2097	No call	I3+56	AC	I3+34	CC	I2+1197	GG	102	GG	5'UTR-26	No call
117	Huacayo	3'UTR+38	AA	3'+37	NoIns	3'+10	CC	324	NoDel	292	CC	291	CC	I3+2015	GG	I3+2097	TT	I3+56	AA	I3+34	CC	I2+1197	GG	102	GG	5'UTR-26	TT
120	Huacayo	3'UTR+38	AA	3'+37	NoIns	3'+10	CC	324	NoDel	292	TC	291	CC	I3+2015	GG	I3+2097	TT	I3+56	AA	I3+34	CC	I2+1197	GG	102	GG	5'UTR-26	TT
122	Huacayo	3'UTR+38	AA	3'+37	NoIns	3'+10	CC	324	NoDel	292	CC	291	CC	I3+2015	GG	I3+2097	TT	I3+56	AA	I3+34	CC	I2+1197	GG	102	GG	5'UTR-26	TT
124	Huacayo	3'UTR+38	No Call	3'+37	No Call	3'+10	No Call	324	No Call	292	No Call	291	No Call	I3+2015	No Call	I3+2097	No Call	I3+56	No Call	I3+34	No Call	I2+1197	No Call	102	No Call	5'UTR-26	No Call
126	Huacayo	3'UTR+38	AA	3'+37	NoIns	3'+10	CC	324	NoDel	292	CC	291	CC	I3+2015	GG	I3+2097	TT	I3+56	AA	I3+34	CC	I2+1197	GG	102	GG	5'UTR-26	TT
137	Huacayo	3'UTR+38	No Call	3'+37	No Call	3'+10	No Call	324	No Call	292	No Call	291	AC	I3+2015	AG	I3+2097	TT	I3+56	AC	I3+34	TC	I2+1197	GA	102	AG	5'UTR-26	TT
138	Huacayo	3'UTR+38	AG	3'+37	A/-	3'+10	No Call	324	Del/-	292	No Call	291	No Call	I3+2015	GG	I3+2097	TT	I3+56	AA	I3+34	CC	I2+1197	GG	102	GG	5'UTR-26	TT
139	Huacayo	3'UTR+38	AG	3'+37	A/-	3'+10	No Call	324	Del/-	292	No Call	291	No Call	I3+2015	No Call	I3+2097	No Call	I3+56	AA	I3+34	CC	I2+1197	GG	102	No Call	5'UTR-26	No Call
140	Huacayo	3'UTR+38	No Call	3'+37	No Call	3'+10	No Call	324	No Call	292	No Call	291	No Call	I3+2015	GG	I3+2097	TT	I3+56	AC	I3+34	CC	I2+1197	GG	102	GG	5'UTR-26	TT
141	Huacayo	3'UTR+38	AA	3'+37	NoIns	3'+10	No Call	324	Del/-	292	CC	291	CC	I3+2015	GG	I3+2097	TT	I3+56	AA	I3+34	CC	I2+1197	GG	102	GG	5'UTR-26	TT
142	Huacayo	3'UTR+38	AA	3'+37	NoIns	3'+10	No Call	324	Del/-	292	No Call	291	No Call	I3+2015	GG	I3+2097	TT	I3+56	AA	I3+34	CC	I2+1197	GG	102	GG	5'UTR-26	TT
143	Huacayo	3'UTR+38	AA	3'+37	NoIns	3'+10	No Call	324	Del/-	292	No Call	291	No Call	I3+2015	GG	I3+2097	TT	I3+56	AA	I3+34	CC	I2+1197	GG	102	GG	5'UTR-26	TT
144	Huacayo	3'UTR+38	AA	3'+37	NoIns	3'+10	No Call	324	Del/-	292	No Call	291	No Call	I3+2015	GG	I3+2097	TT	I3+56	AA	I3+34	CC	I2+1197	GG	102	GG	5'UTR-26	TT
145	Huacayo	3'UTR+38	No Call	3'+37	No Call	3'+10	No Call	324	No Call	292	No Call	291	No Call	I3+2015	GG	I3+2097	TT	I3+56	AA	I3+34	CC	I2+1197	GG	102	GG	5'UTR-26	TT
146	Huacayo	3'UTR+38	No Call	3'+37	No Call	3'+10	No Call	324	No Call	292	No Call	291	No Call	I3+2015	GG	I3+2097	TT	I3+56	AA	I3+34	CC	I2+1197	GG	102	GG	5'UTR-26	TT
147	Huacayo	3'UTR+38	No Call	3'+37	No Call	3'+10	No Call	324	No Call	292	No Call	291	No Call	I3+2015	GG	I3+2097	TT	I3+56	No Call	I3+34	No Call	I2+1197	No Call	102	GG	5'UTR-26	TT
148	Huacayo	3'UTR+38	AA	3'+37	NoIns	3'+10	No Call	324	Del/-	292	No Call	291	No Call	I3+2015	GG	I3+2097	TT	I3+56	AA	I3+34	CC	I2+1197	GG	102	GG	5'UTR-26	TT
149	Suri	3'UTR+38	AA	3'+37	NoIns	3'+10	CC	324	Del/-	292	CC	291	CC	I3+2015	GG	I3+2097	TT	I3+56	AA	I3+34	CC	I2+1197	GG	102	GG	5'UTR-26	TT
150	Huacayo	3'UTR+38	No Call	3'+37	No Call	3'+10	No Call	324	No Call	292	No Call	291	No Call	I3+2015	AG	I3+2097	TT	I3+56	No Call	I3+34	No Call	I2+1197	No Call	102	AG	5'UTR-26	TT
151	Huacayo	3'UTR+38	AA	3'+37	NoIns	3'+10	CC	324	NoDel	292	TC	291	CC	I3+2015	GG	I3+2097	TT	I3+56	AA	I3+34	CC	I2+1197	GG	102	GG	5'UTR-26	TT
158	Huacayo	3'UTR+38	AA	3'+37	NoIns	3'+10	CC	324	NoDel	292	CC	291	CC	I3+2015	GG	I3+2097	TT	I3+56	AA	I3+34	CC	I2+1197	GG	102	GG	5'UTR-26	TT
159	Suri	3'UTR+38	No Call	3'+37	No Call	3'+10	No Call	324	No Call	292	No Call	291	AC	I3+2015	AG	I3+2097	TT	I3+56	CC	I3+34	TC	I2+1197	GA	102	AG	5'UTR-26	TT

176	Huacayo	3'UTR+38	AG	3*37	NoIns	3*10	CC	324	Del/-	292	CC	291	CC	I3+2015	GG	I3+2097	TT	I3+56	AC	I3+34	CC	I2+1197	GG	102	GG	5'UTR-26	TT
178	Huacayo	3'UTR+38	AA	3*37	NoIns	3*10	CC	324	NoDel	292	TC	291	CC	I3+2015	GG	I3+2097	TT	I3+56	AA	I3+34	CC	I2+1197	GG	102	GG	5'UTR-26	TT
180	Huacayo	3'UTR+38	AA	3*37	NoIns	3*10	CC	324	NoDel	292	TT	291	CC	I3+2015	GG	I3+2097	TT	I3+56	AA	I3+34	CC	I2+1197	GG	102	GG	5'UTR-26	TT
181	Suri	3'UTR+38	No Call	3*37	No Call	3*10	No Call	324	No Call	292	No Call	291	No Call	I3+2015	No Call	I3+2097	CT	I3+56	AA	I3+34	No Call	I2+1197	GG	102	GG	5'UTR-26	TC
182	Suri	3'UTR+38	AA	3*37	NoIns	3*10	CC	324	Del/-	292	CC	291	CC	I3+2015	GG	I3+2097	TT	I3+56	AA	I3+34	CC	I2+1197	GG	102	GG	5'UTR-26	TT
184	Suri	3'UTR+38	AG	3*37	NoIns	3*10	TC	324	Del/-	292	No Call	291	AC	I3+2015	AG	I3+2097	TT	I3+56	AC	I3+34	TC	I2+1197	GA	102	AG	5'UTR-26	TT
185	Huacayo	3'UTR+38	No Call	3*37	No call	3*10	No Call	324	No Call	292	No Call	291	No Call	I3+2015	No Call	I3+2097	No call	I3+56	No Call	I3+34	No Call	I2+1197	No Call	102	No Call	5'UTR-26	No call
188	Huacayo	3'UTR+38	No Call	3*37	No call	3*10	No Call	324	No Call	292	No Call	291	No Call	I3+2015	AG	I3+2097	No call	I3+56	No Call	I3+34	No Call	I2+1197	No Call	102	AG	5'UTR-26	No call
191	Suri	3'UTR+38	No Call	3*37	No call	3*10	No Call	324	No Call	292	No Call	291	No Call	I3+2015	No Call	I3+2097	No call	I3+56	No Call	I3+34	No Call	I2+1197	No Call	102	No Call	5'UTR-26	No call
193	Suri	3'UTR+38	AA	3*37	No call	3*10	No Call	324	Del/-	292	No Call	291	No Call	I3+2015	GG	I3+2097	No call	I3+56	AA	I3+34	CC	I2+1197	GG	102	GG	5'UTR-26	No call
194	Huacayo	3'UTR+38	No Call	3*37	No call	3*10	No Call	324	No Call	292	No Call	291	No Call	I3+2015	GG	I3+2097	No call	I3+56	AA	I3+34	CC	I2+1197	GG	102	GG	5'UTR-26	No call
132	Huacayo	3'UTR+38	AA	3*37	NoIns	3*10	CC	324	NoDel	292	CC	291	CC	I3+2015	GG	I3+2097	TT	I3+56	AA	I3+34	CC	I2+1197	GG	102	GG	5'UTR-26	TT
136	Huacayo	3'UTR+38	AA	3*37	NoIns	3*10	CC	324	NoDel	292	TC	291	CC	I3+2015	GG	I3+2097	TT	I3+56	AA	I3+34	CC	I2+1197	GG	102	GG	5'UTR-26	TT
139	Huacayo	3'UTR+38	AA	3*37	NoIns	3*10	CC	324	Del/-	292	CC	291	CC	I3+2015	GG	I3+2097	TT	I3+56	AA	I3+34	CC	I2+1197	GG	102	GG	5'UTR-26	TT
140	Suri	3'UTR+38	AA	3*37	NoIns	3*10	CC	324	Del/-	292	CC	291	CC	I3+2015	GG	I3+2097	TT	I3+56	AA	I3+34	CC	I2+1197	GG	102	GG	5'UTR-26	TT
143	Huacayo	3'UTR+38	AA	3*37	NoIns	3*10	CC	324	Del/-	292	TC	291	CC	I3+2015	GG	I3+2097	TT	I3+56	AA	I3+34	CC	I2+1197	GG	102	GG	5'UTR-26	TT
146	Huacayo	3'UTR+38	AG	3*37	NoIns	3*10	TC	324	Del/-	292	CC	291	AC	I3+2015	AG	I3+2097	TT	I3+56	AC	I3+34	TC	I2+1197	GA	102	AG	5'UTR-26	TT
147	Suri	3'UTR+38	AA	3*37	NoIns	3*10	CC	324	NoDel	292	TC	291	CC	I3+2015	GG	I3+2097	TT	I3+56	AA	I3+34	CC	I2+1197	GG	102	GG	5'UTR-26	TT
149	Huacayo	3'UTR+38	AG	3*37	NoIns	3*10	CC	324	Del/-	292	CC	291	CC	I3+2015	GG	I3+2097	TT	I3+56	AC	I3+34	CC	I2+1197	GG	102	GG	5'UTR-26	TT
152	Suri	3'UTR+38	AA	3*37	NoIns	3*10	CC	324	NoDel	292	CC	291	CC	I3+2015	GG	I3+2097	TT	I3+56	AA	I3+34	CC	I2+1197	GG	102	GG	5'UTR-26	TT
153	Huacayo	3'UTR+38	AG	3*37	NoIns	3*10	TC	324	Del/-	292	CC	291	AC	I3+2015	AG	I3+2097	TT	I3+56	AC	I3+34	TC	I2+1197	GA	102	AG	5'UTR-26	TT
154	Huacayo	3'UTR+38	AA	3*37	NoIns	3*10	CC	324	NoDel	292	CC	291	CC	I3+2015	GG	I3+2097	TT	I3+56	AA	I3+34	CC	I2+1197	GG	102	GG	5'UTR-26	TT
155	Huacayo	3'UTR+38	AA	3*37	NoIns	3*10	CC	324	NoDel	292	CC	291	CC	I3+2015	GG	I3+2097	TT	I3+56	AA	I3+34	CC	I2+1197	GG	102	GG	5'UTR-26	TT
156	Huacayo	3'UTR+38	AA	3*37	NoIns	3*10	CC	324	Del/-	292	CC	291	CC	I3+2015	GG	I3+2097	TT	I3+56	AA	I3+34	CC	I2+1197	GG	102	GG	5'UTR-26	TT
157	Huacayo	3'UTR+38	AA	3*37	NoIns	3*10	CC	324	Del/-	292	CC	291	CC	I3+2015	GG	I3+2097	TT	I3+56	AA	I3+34	CC	I2+1197	GG	102	GG	5'UTR-26	TT
158	Huacayo	3'UTR+38	AA	3*37	NoIns	3*10	CC	324	NoDel	292	TC	291	CC	I3+2015	GG	I3+2097	TT	I3+56	AA	I3+34	CC	I2+1197	GG	102	GG	5'UTR-26	TT
159	Huacayo	3'UTR+38	AA	3*37	NoIns	3*10	CC	324	NoDel	292	TC	291	CC	I3+2015	GG	I3+2097	TT	I3+56	AA	I3+34	CC	I2+1197	GG	102	GG	5'UTR-26	TT
160	Huacayo	3'UTR+38	AG	3*37	NoIns	3*10	CC	324	Del/-	292	CC	291	CC	I3+2015	GG	I3+2097	TT	I3+56	AC	I3+34	CC	I2+1197	GG	102	GG	5'UTR-26	TT
161	Huacayo	3'UTR+38	AA	3*37	NoIns	3*10	CC	324	NoDel	292	CC	291	CC	I3+2015	GG	I3+2097	TT	I3+56	AA	I3+34	CC	I2+1197	GG	102	GG	5'UTR-26	TT
162	Huacayo	3'UTR+38	AA	3*37	NoIns	3*10	CC	324	NoDel	292	TC	291	CC	I3+2015	GG	I3+2097	TT	I3+56	AA	I3+34	CC	I2+1197	GG	102	GG	5'UTR-26	TT





**ANEXO 9.** Alpacas color negro utilizadas en el trabajo de investigación donde no se tomó en cuenta animales que no lograron amplificarse la delección de 57 pares de bases ubicado en la posición 324.

Id	Posición	Cambio	Posición	Cambio	Posición	Cambio	Posición	Cambio	Posición	Cambio	Posición	Cambio	Posición	Cambio	Posición	Cambio	Posición	Cambio	Posición	Cambio	Posición	Cambio	Posición	Cambio		
183	3'UTR+38	AG	3+37	NoIns	3+10	TC	324	Del/-	292	CC	291	AC	I3+2015	AG	I3+2097	TT	I3+56	AC	I3+34	TC	I2+1197	GA	102	GA	5'UTR-26	TT
186	3'UTR+38	No Call	3+37	No call	3+10	No Call	324	No Call	292	No Call	291	No Call	I3+2015	AG	I3+2097	No call	I3+56	No Call	I3+34	No Call	I2+1197	No Call	102	GA	5'UTR-26	No call
195	3'UTR+38	No Call	3+37	No call	3+10	No Call	324	No Call	292	No Call	291	No Call	I3+2015	AA	I3+2097	No call	I3+56	CC	I3+34	TT	I2+1197	AA	102	AA	5'UTR-26	No call
196	3'UTR+38	No Call	3+37	No call	3+10	No Call	324	No Call	292	No Call	291	No Call	I3+2015	AG	I3+2097	No call	I3+56	AC	I3+34	TC	I2+1197	GA	102	GA	5'UTR-26	No call
134	3'UTR+38	GG	3+37	NoIns	3+10	TT	324	Del	292	CC	291	AA	I3+2015	AA	I3+2097	TT	I3+56	CC	I3+34	TT	I2+1197	AA	102	AA	5'UTR-26	TT
141	3'UTR+38	AG	3+37	NoIns	3+10	TC	324	Del/-	292	CC	291	AC	I3+2015	AG	I3+2097	TT	I3+56	AC	I3+34	TC	I2+1197	GA	102	GA	5'UTR-26	TT
142	3'UTR+38	GG	3+37	NoIns	3+10	TC	324	Del	292	CC	291	AC	I3+2015	AG	I3+2097	TT	I3+56	CC	I3+34	TC	I2+1197	GA	102	GA	5'UTR-26	TT
144	3'UTR+38	No Call	3+37	No Call	3+10	No Call	324	No Call	292	No Call	291	No Call	I3+2015	GG	I3+2097	TT	I3+56	No Call	I3+34	No Call	I2+1197	No Call	102	GG	5'UTR-26	TT
148	3'UTR+38	AG	3+37	NoIns	3+10	TC	324	Del/-	292	TC	291	AC	I3+2015	AG	I3+2097	TT	I3+56	AC	I3+34	TC	I2+1197	GA	102	GA	5'UTR-26	TT
111	3'UTR+38	No Call	3+37	No Call	3+10	TC	324	Del	292	No Call	291	AC	I3+2015	AG	I3+2097	TT	I3+56	CC	I3+34	TC	I2+1197	GA	102	GA	5'UTR-26	TT
133	3'UTR+38	AG	3+37	NoIns	3+10	TC	324	Del/-	292	TC	291	AC	I3+2015	AG	I3+2097	TT	I3+56	AC	I3+34	TC	I2+1197	GA	102	GA	5'UTR-26	TT
190	3'UTR+38	AG	3+37	NoIns	3+10	No Call	324	Del/-	292	TC	291	AC	I3+2015	No Call	I3+2097	No Call	I3+56	AC	I3+34	TC	I2+1197	GA	102	No Call	5'UTR-26	No Call
125	3'UTR+38	GG	3+37	NoIns	3+10	CC	324	Del	292	CC	291	CC	I3+2015	No Call	I3+2097	No Call	I3+56	CC	I3+34	CC	I2+1197	GG	102	No Call	5'UTR-26	No Call
126	3'UTR+38	GG	3+37	NoIns	3+10	CC	324	Del	292	CC	291	CC	I3+2015	GG	I3+2097	TT	I3+56	CC	I3+34	CC	I2+1197	GG	102	GG	5'UTR-26	TT
141	3'UTR+38	No Call	3+37	No Call	3+10	No Call	324	No Call	292	No Call	291	No Call	I3+2015	AA	I3+2097	TT	I3+56	No Call	I3+34	No Call	I2+1197	No Call	102	AA	5'UTR-26	TT
144	3'UTR+38	No Call	3+37	No Call	3+10	No Call	324	No Call	292	No Call	291	No Call	I3+2015	AA	I3+2097	TT	I3+56	No Call	I3+34	No Call	I2+1197	No Call	102	AA	5'UTR-26	TT
145	3'UTR+38	AG	3+37	NoIns	3+10	TC	324	No Call	292	TC	291	AC	I3+2015	No Call	I3+2097	No Call	I3+56	AC	I3+34	TC	I2+1197	GA	102	No Call	5'UTR-26	No Call
151	3'UTR+38	No Call	3+37	No Call	3+10	No Call	324	No Call	292	No Call	291	No Call	I3+2015	AG	I3+2097	TT	I3+56	No Call	I3+34	No Call	I2+1197	GA	102	No Call	5'UTR-26	No Call
242	3'UTR+38	No Call	3+37	No Call	3+10	No Call	324	No Call	292	No Call	291	AC	I3+2015	AG	I3+2097	TT	I3+56	CC	I3+34	TC	I2+1197	GA	102	GA	5'UTR-26	TT
243	3'UTR+38	No Call	3+37	No Call	3+10	TT	324	Del	292	No Call	291	AA	I3+2015	AA	I3+2097	TT	I3+56	CC	I3+34	TT	I2+1197	AA	102	AA	5'UTR-26	TT
246	3'UTR+38	No Call	3+37	No Call	3+10	No Call	324	No Call	292	No Call	291	No Call	I3+2015	AG	I3+2097	TT	I3+56	No Call	I3+34	No Call	I2+1197	No Call	102	GA	5'UTR-26	No Call
133	3'UTR+38	AG	3+37	NoIns	3+10	TC	324	Del/-	292	CC	291	AC	I3+2015	AG	I3+2097	TT	I3+56	AC	I3+34	TC	I2+1197	GA	102	GA	5'UTR-26	TT
146	3'UTR+38	AA	3+37	NoIns	3+10	CC	324	Del/-	292	CC	291	CC	I3+2015	GG	I3+2097	TT	I3+56	AA	I3+34	CC	I2+1197	GG	102	GG	5'UTR-26	TT
147	3'UTR+38	AA	3+37	NoIns	3+10	CC	324	Del/-	292	TC	291	CC	I3+2015	GG	I3+2097	TT	I3+56	AA	I3+34	CC	I2+1197	GG	102	GG	5'UTR-26	TT



148	3'UTR+38	AG	3+37	NoIns	3+10	TC	324	Del/-	292	CC	291	AC	I3+2015	AG	I3+2097	TT	I3+56	CC	I3+34	TT	I2+1197	AA	102	AA	5'UTR-26	TT
149	3'UTR+38	AA	3+37	NoIns	3+10	CC	324	NoDel	292	TC	291	CC	I3+2015	GG	I3+2097	TT	I3+56	AA	I3+34	CC	I2+1197	GG	102	GG	5'UTR-26	TT
150	3'UTR+38	AA	3+37	NoIns	3+10	CC	324	Del/-	292	CC	291	CC	I3+2015	GG	I3+2097	TT	I3+56	AA	I3+34	CC	I2+1197	GG	102	GG	5'UTR-26	TT
151	3'UTR+38	AG	3+37	NoIns	3+10	CC	324	No Call	292	CC	291	CC	I3+2015	GG	I3+2097	TT	I3+56	AC	I3+34	CC	I2+1197	GG	102	GG	5'UTR-26	TT
152	3'UTR+38	GG	3+37	NoIns	3+10	TT	324	Del	292	CC	291	AA	I3+2015	AA	I3+2097	TT	I3+56	CC	I3+34	TT	I2+1197	AA	102	AA	5'UTR-26	TT
153	3'UTR+38	AG	3+37	NoIns	3+10	TC	324	Del/-	292	TC	291	AC	I3+2015	No Call	I3+2097	No Call	I3+56	AC	I3+34	TC	I2+1197	GA	102	No Call	5'UTR-26	No Call
154	3'UTR+38	AA	3+37	NoIns	3+10	CC	324	Del/-	292	CC	291	CC	I3+2015	No Call	I3+2097	No Call	I3+56	AA	I3+34	CC	I2+1197	GG	102	No Call	5'UTR-26	No Call
155	3'UTR+38	No Call	3+37	No Call	3+10	No Call	324	No Call	292	No Call	291	No Call	I3+2015	No Call	I3+2097	No Call	I3+56	No Call	I3+34	No Call	I2+1197	No Call	102	No Call	5'UTR-26	No Call
156	3'UTR+38	AA	3+37	NoIns	3+10	CC	324	Del/-	292	TC	291	CC	I3+2015	No Call	I3+2097	No Call	I3+56	AA	I3+34	CC	I2+1197	GG	102	No Call	5'UTR-26	No Call
301	3'UTR+38	No call	3+37	No call	3+10	TT	324	Del/-	292	No call	291	AA	I3+2015	AA	I3+2097	No call	I3+56	No call	I3+34	TT	I2+1197	No call	102	No call	5'UTR-26	No call
302	3'UTR+38	AA	3+37	No call	3+10	No call	324	NoDel	292	No call	291	No call	I3+2015	No call	I3+2097	No call	I3+56	AA	I3+34	No call	I2+1197	GG	102	GG	5'UTR-26	No call
303	3'UTR+38	AG	3+37	No call	3+10	No call	324	Del/-	292	TC	291	No call	I3+2015	No call	I3+2097	No call	I3+56	AC	I3+34	No call	I2+1197	GG	102	GG	5'UTR-26	No call
304	3'UTR+38	No call	3+37	No call	3+10	No call	324	No call	292	No call	291	No call	I3+2015	No call	I3+2097	No call	I3+56	No call	I3+34	No call	I2+1197	GG	102	GG	5'UTR-26	No call
305	3'UTR+38	AA	3+37	No call	3+10	No call	324	NoDel	292	No call	291	No call	I3+2015	No call	I3+2097	No call	I3+56	AA	I3+34	No call	I2+1197	GG	102	GG	5'UTR-26	No call
306	3'UTR+38	No call	3+37	No call	3+10	TC	324	Del/-	292	No call	291	AC	I3+2015	AG	I3+2097	No call	I3+56	No call	I3+34	TC	I2+1197	GA	102	GA	5'UTR-26	No call
307	3'UTR+38	AG	3+37	No call	3+10	No call	324	Del/-	292	TC	291	No call	I3+2015	No call	I3+2097	No call	I3+56	AC	I3+34	No call	I2+1197	GG	102	GG	5'UTR-26	No call
308	3'UTR+38	AG	3+37	No call	3+10	TC	324	Del/-	292	TC	291	AC	I3+2015	AG	I3+2097	No call	I3+56	AC	I3+34	TC	I2+1197	GA	102	GA	5'UTR-26	No call
309	3'UTR+38	AG	3+37	No call	3+10	TC	324	Del/-	292	TC	291	AC	I3+2015	AG	I3+2097	No call	I3+56	AC	I3+34	TC	I2+1197	GA	102	GA	5'UTR-26	No call
310	3'UTR+38	AG	3+37	No call	3+10	TC	324	Del/-	292	TC	291	AC	I3+2015	AG	I3+2097	No call	I3+56	AC	I3+34	TC	I2+1197	GA	102	GA	5'UTR-26	No call
311	3'UTR+38	AA	3+37	No call	3+10	No call	324	NoDel	292	No call	291	No call	I3+2015	No call	I3+2097	No call	I3+56	AA	I3+34	No call	I2+1197	GG	102	GG	5'UTR-26	No call
312	3'UTR+38	AA	3+37	No call	3+10	No call	324	NoDel	292	TT	291	No call	I3+2015	No call	I3+2097	No call	I3+56	AA	I3+34	No call	I2+1197	GG	102	GG	5'UTR-26	No call
313	3'UTR+38	AG	3+37	No call	3+10	TC	324	Del/-	292	No call	291	AC	I3+2015	AG	I3+2097	No call	I3+56	AC	I3+34	TC	I2+1197	GA	102	GA	5'UTR-26	No call
314	3'UTR+38	No call	3+37	No call	3+10	No call	324	No call	292	No call	291	No call	I3+2015	No call	I3+2097	No call	I3+56	No call	I3+34	No call	I2+1197	GG	102	GG	5'UTR-26	No call
315	3'UTR+38	AG	3+37	No call	3+10	TC	324	Del/-	292	TC	291	AC	I3+2015	AG	I3+2097	No call	I3+56	AC	I3+34	TC	I2+1197	GA	102	GA	5'UTR-26	No call
316	3'UTR+38	AG	3+37	No call	3+10	TC	324	Del/-	292	TC	291	AC	I3+2015	AG	I3+2097	No call	I3+56	AC	I3+34	TC	I2+1197	GA	102	GA	5'UTR-26	No call
317	3'UTR+38	No call	3+37	No call	3+10	TT	324	Del/-	292	No call	291	AA	I3+2015	AG	I3+2097	No call	I3+56	No call	I3+34	TT	I2+1197	No call	102	No call	5'UTR-26	No call
318	3'UTR+38	AG	3+37	No call	3+10	No call	324	Del/-	292	No call	291	No call	I3+2015	No call	I3+2097	No call	I3+56	AC	I3+34	No call	I2+1197	GG	102	GG	5'UTR-26	No call
319	3'UTR+38	AG	3+37	No call	3+10	TC	324	Del/-	292	TC	291	AC	I3+2015	AG	I3+2097	No call	I3+56	AC	I3+34	TC	I2+1197	GA	102	GA	5'UTR-26	No call
320	3'UTR+38	AG	3+37	No call	3+10	TC	324	Del/-	292	TC	291	AC	I3+2015	AG	I3+2097	No call	I3+56	AC	I3+34	TC	I2+1197	GA	102	GA	5'UTR-26	No call
321	3'UTR+38	AG	3+37	No call	3+10	TC	324	Del/-	292	TC	291	AC	I3+2015	AG	I3+2097	No call	I3+56	AC	I3+34	TC	I2+1197	GA	102	GA	5'UTR-26	No call



370	3'UTR+38	AA	3+37	No call	3+10	No call	324	NoDel	292	TT	291	No call	I3+2015	No call	I3+2097	No call	I3+56	AA	I3+34	No call	I2+1197	GG	102	GG	5'UTR-26	No call
371	3'UTR+38	No call	3+37	No call	3+10	TT	324	Del/-	292	No call	291	AA	I3+2015	AA	I3+2097	No call	I3+56	No call	I3+34	TT	I2+1197	No call	102	No call	5'UTR-26	No call
372	3'UTR+38	AG	3+37	No call	3+10	TC	324	Del/-	292	TC	291	AC	I3+2015	AG	I3+2097	No call	I3+56	AC	I3+34	TC	I2+1197	GA	102	GA	5'UTR-26	No call
373	3'UTR+38	No call	3+37	No call	3+10	TC	324	Del/-	292	No call	291	AC	I3+2015	AG	I3+2097	No call	I3+56	No call	I3+34	TC	I2+1197	GA	102	GA	5'UTR-26	No call
374	3'UTR+38	No call	3+37	No call	3+10	TT	324	Del/-	292	No call	291	AA	I3+2015	AA	I3+2097	No call	I3+56	No call	I3+34	TT	I2+1197	No call	102	No call	5'UTR-26	No call
375	3'UTR+38	AG	3+37	No call	3+10	TC	324	Del/-	292	TC	291	AC	I3+2015	AG	I3+2097	No call	I3+56	AC	I3+34	TC	I2+1197	GA	102	GA	5'UTR-26	No call

Alpacas color negro utilizadas en el trabajo de investigación donde no se tomó en cuenta animales que no lograron amplificarse la delección de 57 pares de bases ubicado en la posición 324

Id animal	Posición	Cambio	Posición	Cambio	Posición	Cambio	Posición	Cambio	Posición	Cambio	Posición	Cambio	Posición	Cambio	Posición	Cambio	Posición	Cambio	Posición	Cambio	Posición	Cambio	Posición	Cambio	Posición	Cambio
102	3'UTR+38	No Call	3+37	No call	3+10	CC	324	No Call	292	CC	291	CC	I3+2015	GG	I3+2097	No call	I3+56	AC	I3+34	CC	I2+1197	GG	102	GG	5'UTR-26	No call
103	3'UTR+38	No Call	3+37	No call	3+10	No Call	324	No Call	292	No Call	291	No Call	I3+2015	AG	I3+2097	No call	I3+56	No Call	I3+34	No Call	I2+1197	No Call	102	GA	5'UTR-26	No call
104	3'UTR+38	No Call	3+37	No call	3+10	No Call	324	No Call	292	No Call	291	No Call	I3+2015	AG	I3+2097	No call	I3+56	No Call	I3+34	No Call	I2+1197	No Call	102	GA	5'UTR-26	No call
105	3'UTR+38	No Call	3+37	No call	3+10	TT	324	Del	292	CC	291	AA	I3+2015	AA	I3+2097	No call	I3+56	CC	I3+34	TT	I2+1197	AA	102	AA	5'UTR-26	No call
111	3'UTR+38	AA	3+37	No call	3+10	CC	324	Del/-	292	CC	291	CC	I3+2015	GG	I3+2097	No call	I3+56	AA	I3+34	CC	I2+1197	GG	102	GG	5'UTR-26	No call
114	3'UTR+38	No Call	3+37	No call	3+10	TC	324	Del/-	292	TC	291	AC	I3+2015	AG	I3+2097	No call	I3+56	AC	I3+34	TC	I2+1197	GA	102	GA	5'UTR-26	No call
118	3'UTR+38	AA	3+37	Nolns	3+10	CC	324	NoDel	292	CC	291	CC	I3+2015	GG	I3+2097	TT	I3+56	AA	I3+34	CC	I2+1197	GG	102	GG	5'UTR-26	TT
121	3'UTR+38	AA	3+37	Nolns	3+10	CC	324	Del/-	292	TC	291	CC	I3+2015	GG	I3+2097	TT	I3+56	AA	I3+34	CC	I2+1197	GG	102	GG	5'UTR-26	TT
123	3'UTR+38	AA	3+37	Nolns	3+10	CC	324	NoDel	292	TC	291	CC	I3+2015	No Call	I3+2097	No Call	I3+56	AA	I3+34	CC	I2+1197	GG	102	No Call	5'UTR-26	No Call
125	3'UTR+38	AG	3+37	Nolns	3+10	TC	324	Del/-	292	CC	291	AC	I3+2015	AG	I3+2097	TT	I3+56	AC	I3+34	TC	I2+1197	GA	102	GA	5'UTR-26	TT
127	3'UTR+38	AG	3+37	Nolns	3+10	TC	324	Del/-	292	TC	291	AC	I3+2015	AG	I3+2097	TT	I3+56	AC	I3+34	TC	I2+1197	GA	102	GA	5'UTR-26	TT
128	3'UTR+38	AG	3+37	Nolns	3+10	TC	324	Del/-	292	CC	291	AC	I3+2015	AG	I3+2097	TT	I3+56	AC	I3+34	TC	I2+1197	GA	102	GA	5'UTR-26	TT
154	3'UTR+38	AG	3+37	Nolns	3+10	TC	324	Del/-	292	TC	291	AC	I3+2015	AG	I3+2097	TT	I3+56	AC	I3+34	TC	I2+1197	GA	102	GA	5'UTR-26	TT
155	3'UTR+38	AG	3+37	Nolns	3+10	TC	324	Del/-	292	CC	291	AC	I3+2015	No Call	I3+2097	No Call	I3+56	AC	I3+34	TC	I2+1197	GA	102	No Call	5'UTR-26	No Call
156	3'UTR+38	AA	3+37	Nolns	3+10	CC	324	NoDel	292	TC	291	CC	I3+2015	GG	I3+2097	TT	I3+56	AA	I3+34	CC	I2+1197	GG	102	GG	5'UTR-26	TT
157	3'UTR+38	No Call	3+37	No Call	3+10	TC	324	No Call	292	No Call	291	AC	I3+2015	AG	I3+2097	TT	I3+56	CC	I3+34	TC	I2+1197	GA	102	GA	5'UTR-26	TT
174	3'UTR+38	AG	3+37	Nolns	3+10	CC	324	Del/-	292	TC	291	CC	I3+2015	GG	I3+2097	TT	I3+56	AC	I3+34	CC	I2+1197	GG	102	GG	5'UTR-26	TT
175	3'UTR+38	AA	3+37	Nolns	3+10	CC	324	NoDel	292	TC	291	CC	I3+2015	GG	I3+2097	TT	I3+56	AA	I3+34	CC	I2+1197	GG	102	GG	5'UTR-26	TT

129	3'UTR+38	GG	3+37	Nolns	3+10	TT	324	Del	292	CC	291	AA	I3+2015	AA	I3+2097	TT	I3+56	CC	I3+34	TT	I2+1197	AA	102	AA	5'UTR-26	TT
130	3'UTR+38	AA	3+37	Nolns	3+10	CC	324	Del/-	292	TC	291	CC	I3+2015	GG	I3+2097	TT	I3+56	AA	I3+34	CC	I2+1197	GG	102	GG	5'UTR-26	TT
137	3'UTR+38	AG	3+37	Nolns	3+10	TC	324	Del/-	292	TC	291	AC	I3+2015	AG	I3+2097	TT	I3+56	AC	I3+34	TC	I2+1197	GA	102	GA	5'UTR-26	TT
145	3'UTR+38	AA	3+37	Nolns	3+10	CC	324	NoDel	292	TC	291	CC	I3+2015	GG	I3+2097	TT	I3+56	AA	I3+34	CC	I2+1197	GG	102	GG	5'UTR-26	TT
150	3'UTR+38	GG	3+37	Nolns	3+10	TT	324	Del	292	CC	291	AA	I3+2015	AA	I3+2097	TT	I3+56	CC	I3+34	TT	I2+1197	AA	102	AA	5'UTR-26	TT
151	3'UTR+38	AG	3+37	Nolns	3+10	CC	324	Del/-	292	CC	291	CC	I3+2015	GG	I3+2097	TT	I3+56	AC	I3+34	CC	I2+1197	GG	102	GG	5'UTR-26	TT
163	3'UTR+38	AA	3+37	Nolns	3+10	CC	324	Del/-	292	CC	291	CC	I3+2015	No Call	I3+2097	No Call	I3+56	AA	I3+34	CC	I2+1197	GG	102	No Call	5'UTR-26	No Call
175	3'UTR+38	No Call	3+37	No Call	3+10	No Call	324	No Call	292	No Call	291	No Call	I3+2015	No Call	I3+2097	No Call	I3+56	No Call	I3+34	No Call	I2+1197	No Call	102	No Call	5'UTR-26	No Call
110	3'UTR+38	AA	3+37	Nolns	3+10	No Call	324	Del/-	292	TC	291	No Call	I3+2015	GG	I3+2097	TT	I3+56	AA	I3+34	CC	I2+1197	GG	102	GG	5'UTR-26	TT
124	3'UTR+38	AA	3+37	Nolns	3+10	CC	324	NoDel	292	CC	291	CC	I3+2015	GG	I3+2097	TT	I3+56	AA	I3+34	CC	I2+1197	GG	102	GG	5'UTR-26	TT
125	3'UTR+38	AA	3+37	Nolns	3+10	CC	324	NoDel	292	CC	291	CC	I3+2015	GG	I3+2097	TT	I3+56	AA	I3+34	CC	I2+1197	GG	102	GG	5'UTR-26	TT
130	3'UTR+38	No Call	3+37	No Call	3+10	No Call	324	No Call	292	No Call	291	No Call	I3+2015	No Call	I3+2097	No Call	I3+56	No Call	I3+34	No Call	I2+1197	No Call	102	No Call	5'UTR-26	No Call
140	3'UTR+38	No Call	3+37	No Call	3+10	No Call	324	No Call	292	No Call	291	No Call	I3+2015	AG	I3+2097	TT	I3+56	No Call	I3+34	No Call	I2+1197	No Call	102	GA	5'UTR-26	TT
143	3'UTR+38	No Call	3+37	No Call	3+10	TT	324	Del	292	CC	291	AA	I3+2015	AA	I3+2097	TT	I3+56	CC	I3+34	TT	I2+1197	AA	102	AA	5'UTR-26	TT
185	3'UTR+38	GG	3+37	Nolns	3+10	TT	324	Del	292	CC	291	AA	I3+2015	No Call	I3+2097	No Call	I3+56	CC	I3+34	TT	I2+1197	AA	102	No Call	5'UTR-26	No Call
188	3'UTR+38	AA	3+37	Nolns	3+10	CC	324	Del/-	292	TC	291	CC	I3+2015	GG	I3+2097	TT	I3+56	AA	I3+34	CC	I2+1197	GG	102	GG	5'UTR-26	TT
132	3'UTR+38	AG	3+37	Nolns	3+10	TC	324	Del/-	292	CC	291	AC	I3+2015	No Call	I3+2097	No Call	I3+56	AC	I3+34	TC	I2+1197	GA	102	No Call	5'UTR-26	No Call
135	3'UTR+38	GG	3+37	Nolns	3+10	TC	324	Del	292	CC	291	AC	I3+2015	AG	I3+2097	TT	I3+56	CC	I3+34	TC	I2+1197	GA	102	GA	5'UTR-26	TT
150	3'UTR+38	No Call	3+37	No Call	3+10	No Call	324	No Call	292	No Call	291	No Call	I3+2015	AG	I3+2097	TT	I3+56	No Call	I3+34	No Call	I2+1197	GA	102	No Call	5'UTR-26	No Call
154	3'UTR+38	No Call	3+37	No Call	3+10	No Call	324	No Call	292	No Call	291	No Call	I3+2015	AG	I3+2097	No Call	I3+56	No Call	I3+34	No Call	I2+1197	No Call	102	No Call	5'UTR-26	No Call
155	3'UTR+38	No Call	3+37	No Call	3+10	No Call	324	No Call	292	No Call	291	No Call	I3+2015	GG	I3+2097	TT	I3+56	No Call	I3+34	No Call	I2+1197	GA	102	No Call	5'UTR-26	No Call
156	3'UTR+38	No Call	3+37	No Call	3+10	No Call	324	No Call	292	No Call	291	No Call	I3+2015	No Call	I3+2097	No Call	I3+56	No Call	I3+34	No Call	I2+1197	No Call	102	No Call	5'UTR-26	No Call
201	3'UTR+38	AA	3+37	Nolns	3+10	CC	324	NoDel	292	TC	291	CC	I3+2015	GG	I3+2097	TT	I3+56	AA	I3+34	CC	I2+1197	GG	102	GG	5'UTR-26	TT
203	3'UTR+38	AA	3+37	Nolns	3+10	CC	324	NoDel	292	CC	291	CC	I3+2015	GG	I3+2097	TT	I3+56	AA	I3+34	CC	I2+1197	GG	102	GG	5'UTR-26	TT
204	3'UTR+38	AG	3+37	Nolns	3+10	CC	324	Del/-	292	CC	291	CC	I3+2015	GG	I3+2097	TT	I3+56	AC	I3+34	CC	I2+1197	GG	102	GG	5'UTR-26	TT
205	3'UTR+38	AA	3+37	Nolns	3+10	CC	324	NoDel	292	TT	291	CC	I3+2015	GG	I3+2097	TT	I3+56	AA	I3+34	CC	I2+1197	GG	102	GG	5'UTR-26	TT
206	3'UTR+38	AG	3+37	Nolns	3+10	CC	324	Del/-	292	CC	291	CC	I3+2015	GG	I3+2097	TT	I3+56	AC	I3+34	CC	I2+1197	GG	102	GG	5'UTR-26	TT
210	3'UTR+38	AG	3+37	Nolns	3+10	TC	324	Del/-	292	CC	291	AC	I3+2015	AG	I3+2097	TT	I3+56	AC	I3+34	TC	I2+1197	GA	102	GA	5'UTR-26	TT
211	3'UTR+38	AG	3+37	Nolns	3+10	TC	324	Del/-	292	TC	291	AC	I3+2015	AG	I3+2097	TT	I3+56	AC	I3+34	TC	I2+1197	GA	102	GA	5'UTR-26	TT
213	3'UTR+38	No Call	3+37	No Call	3+10	No Call	324	No Call	292	No Call	291	No Call	I3+2015	GG	I3+2097	TT	I3+56	No Call	I3+34	No Call	I2+1197	No Call	102	No Call	5'UTR-26	No Call

215	3UTR+38	AG	3+37	Nolns	3+10	TC	324	Del/-	292	CC	291	AC	I3+2015	AG	I3+2097	TT	I3+56	AC	I3+34	TC	I2+1197	GA	102	GA	5UTR-26	TT
216	3UTR+38	AG	3+37	Nolns	3+10	TC	324	Del/-	292	TC	291	AC	I3+2015	AG	I3+2097	TT	I3+56	AC	I3+34	TC	I2+1197	GA	102	GA	5UTR-26	TT
219	3UTR+38	AA	3+37	Nolns	3+10	CC	324	Del/-	292	CC	291	CC	I3+2015	GG	I3+2097	TT	I3+56	AA	I3+34	CC	I2+1197	GG	102	GG	5UTR-26	TT
237	3UTR+38	No Call	3+37	No Call	3+10	No Call	324	No Call	292	No Call	291	No Call	I3+2015	No Call	I3+2097	No Call	I3+56	No Call	I3+34	No Call	I2+1197	No Call	102	No Call	5UTR-26	No Call
239	3UTR+38	AA	3+37	Nolns	3+10	No Call	324	Del/-	292	TC	291	No Call	I3+2015	No Call	I3+2097	No Call	I3+56	AA	I3+34	CC	I2+1197	GG	102	No Call	5UTR-26	No Call
240	3UTR+38	No Call	3+37	No Call	3+10	No Call	324	No Call	292	No Call	291	No Call	I3+2015	GG	I3+2097	TT	I3+56	AC	I3+34	CC	I2+1197	GG	102	GG	5UTR-26	No Call
241	3UTR+38	No Call	3+37	No Call	3+10	TT	324	Del	292	No Call	291	AA	I3+2015	No Call	I3+2097	No Call	I3+56	CC	I3+34	TT	I2+1197	AA	102	No Call	5UTR-26	No Call