

UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN ANTONIO ABAD DEL CUSCO

FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS

ESCUELA PROFESIONAL DE MEDICINA VETERINARIA



“Secuenciación del gen IRF4 e identificación de variaciones asociadas con fenotipos de color de fibra en alpacas”

Tesis presentada por el Bachiller en Medicina Veterinaria:
ANDRÉ LEONARD FARFÁN SUÁREZ, para optar el
título profesional de **MÉDICO VETERINARIO**.

ASESORES:

Ing. Zoot. PhD. VICTOR LOPEZ DURAND.

MVZ. PhD. CAROLA MELO ROJAS.

FINANCIADO CON FONDOS CANON – UNSAAC.

CUSCO – PERÚ

2022



INFORME DE ORIGINALIDAD

El que suscribe asesor del trabajo de investigación titulado **SECUENCIACIÓN DEL GEN IRF4 E IDENTIFICACIÓN DE VARIACIONES ASOCIADAS CON FENOTIPOS DE COLOR DE FIBRA EN ALPACAS** Código(estudiante) 122644 para optar al Grado de Título Profesional MEDICO VETERINARIO

Informo que el trabajo de investigación ha sido sometido a revisión por Ing. Zoot. Víctor López Durand Mgt. Dr., mediante el software antiplagio, conforme al Artículo 6° del presente reglamento y de la evaluación de originalidad se tiene un porcentaje de "no se encontraron coincidencias"

Evaluación y acciones del reporte de coincidencia para trabajos de investigación, tesis, textos, libros, revistas, artículos científicos, material de enseñanza y otros (Art. 7, inc 2 y 3)

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.	
Mayores 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 software antiplagio.

Cusco, 28 de

POST FIRMA: Ing. Zoot. Víctor López Durand

DNI N°: 23834214



UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN ANTONIO ABAD DEL CUSCO
VICE RECTORADO DE INVESTIGACIÓN

Se adjunta

1. Reporte Generado por el sistema Antiplagio



ANDRE TESIS FINAL DICTAMINANTES 2.docx
8 de septiembre de 2021
37191 palabras / 203195 caracteres

ANDRÉ LEONARD FARFÁN SUÁREZ

ANDRE TESIS FINAL DICTAMINANTES 2.docx

No Se Encontraron Coincidencias.

Esta entrega no coincidió con ningún contenido de nuestras bases de datos.

Se excluyeron los depósitos de búsqueda:

- Trabajos entregados
- Internet
- Publicaciones
- Crossref
- Contenido disponible en Crossref

Excluido del Informe de Similitud:

- Ninguno

Se excluyeron las fuentes:

- Ninguno

Ing. Zoot, Víctor López Durand
ASESOR PRINCIPAL

2. Enlace del Reporte Generado por el Sistema Antiplagio:
<https://unsaac.turnitin.com/viewer/submissions/oid:27259:102970036/print?locale=es>

ÍNDICE GENERAL

DEDICATORIA	V
AGRADECIMIENTOS	VI
ÍNDICE DE TABLAS	VII
ÍNDICE DE FIGURAS	VIII
LISTADO DE ABREVIATURAS.....	X
RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	2
CAPÍTULO I	4
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	4
1.1. Desarrollo del problema	4
1.1.1. Problema general	5
1.1.2. Problemas específicos.....	5
1.2. Objetivos.....	6
1.2.1. Objetivos generales.....	6
1.2.2. Objetivos específicos	6
1.3. Hipótesis	7
1.3.1. Hipótesis general	7
1.3.2. Hipótesis específica	7
1.4. Justificación	8
CAPÍTULO II.....	9
MARCO TEÓRICO.....	9
2.1. Antecedentes de la investigación.....	9
2.2. Revisión bibliográfica.....	14
2.3. Marco conceptual.....	14
2.3.1. Importancia de los Camélidos Sudamericanos.	14
2.3.2. La alpaca.....	14
2.3.3. Color de capa en mamíferos.	15
2.3.4. El sistema pigmentario de mamíferos.....	16
2.3.5. Pigmentación	17
2.3.6. Síntesis de pigmento.	17
2.3.7. Melanocitos.....	18
2.3.8. Melanocitos en el folículo piloso.....	20

	III
2.3.9.	Polimorfismo genético: importancia y aplicaciones..... 21
2.3.10.	Polimorfismo de nucleótido simple (SNP)..... 22
2.3.11.	Los polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) del gen IRF4 viculados a fenotipos específicos..... 23
2.3.12.	Marcadores Moleculares..... 25
2.3.13.	Melanogenia 26
2.3.14.	Gen IRF4 27
2.3.15.	Estructura del gen IFR4..... 28
2.3.16.	IFR4 en la pigmentación..... 28
2.3.17.	Secuenciación del ADN..... 29
2.3.18.	Ion S5 sistema de secuenciación de próxima generación para la secuenciación dirigida 31
2.3.19.	Preparación de bibliotecas 32
2.3.20.	Amplificación de platilla con sistema ion onetouch 2 TM 33
2.3.21.	Enriquecimiento de plantillas positivas de los ISP ion 520 TM 36
2.3.22.	Secuenciación con Chip ion 520 TM 37
CAPÍTULO III 39
3. DISEÑO DE LA INVESTIGACIÓN 39
3.1.	Ámbito de estudio..... 39
3.1.1.	Ubicación Geográfica 39
3.1.2.	Duración del estudio 39
3.2.	Materiales de estudio 40
3.2.1.	Material biológico..... 40
3.2.2.	Materiales para trabajo de campo 40
3.2.2.1.	Materiales para muestreo de sangre periférica 40
3.2.3.	Materiales para el trabajo en Laboratorio..... 41
3.2.3.1.	Materiales para la extracción y cuantificación de ADN..... 41
3.2.3.2.	Materiales para la secuenciación de ADN 41
3.2.4.	Equipo de laboratorio 42
3.2.4.1.	Extracción de tejido sanguíneo 42
3.2.4.2.	Extracción de ADN 42
3.2.4.3.	Cuantificación del ADN..... 43
3.2.4.4.	Secuenciación de ADN 43
3.2.5.	Bioinformática 44
3.3.	Método de la investigación..... 44

	IV
3.4.	Evaluación en el laboratorio45
3.4.2.	Laboratorio del Centro de Investigación en Camélidos Sudamericano “CICAS la Raya” 45
3.5.	Metodología de estudio.....45
3.6.	VARIABLES EVALUADAS EN EL ESTUDIO45
3.6.2.	Variable independiente 45
3.6.3.	Variable dependiente 45
3.6.4.	Flujo grama 46
3.6.5.	Obtención de muestras sanguíneas 47
3.6.6.	Diseño de primers 48
3.6.7.	Extracción de ADN..... 50
3.6.8.	Secuenciación de ADN..... 51
3.6.8.1.	Preparación de ADN para bibliotecas del gen IRF452
3.6.8.2.	Amplificación y enriquecimiento de platilla con Sistema Ion OneTouch™ 2 del gen IRF4.....59
3.6.8.3.	Enriquecimiento de las esferas iónicas positivas63
3.6.8.4.	Realizar la carrera en el OneTouch™ ES.....66
3.6.9.	Análisis de datos68
3.7.	Aplicación estadística70
CAPÍTULO IV 71
4. RESULTADOS 71
4.1.	Identificación de variantes del gen IRF4 asociadas al color de fibra en alpacas mediante el tipo de variante polimórfica71
4.2.	Identificación de variantes del gen IRF4 asociadas al color de fibra en alpacas mediante mediante número de variantes encontrados en exones73
4.3.	Identificación de variantes del gen IRF4 asociadas al color de fibra en alpacas mediante número de variantes encontrados en intrones74
4.4.	Estudios de asociación entre el gen IRF4 y polimorfismos con relación al color en alpacas.....76
DISCUSIONES 77
CONCLUSIONES78
BIBLIOGRAFÍAS 80
ANEXOS 102

DEDICATORIA

A mi madre y padre:

Elizabeth Leocadia Suárez Farfán

Por acompañarme en todo momento, velar por mi salud, conducirme por el camino del bien, por darme fortaleza en los momentos más difíciles a lo largo de esta carrera y por su invaluable amor que siempre me demostró.

A mis hermanas

Quienes fueron un estímulo para iniciar y concluir mis estudios, gracias por su apoyo incondicional cuando siempre las necesité.

André Leonard Farfán Suarez

AGRADECIMIENTOS

- Mi eterna gratitud a todos los docentes de la Carrera Profesional de Medicina Veterinaria por sus valiosas enseñanzas durante mi formación profesional.
- A mis asesores: Mgt. Víctor López Durand, Mvz. PhD. Carola Melo Rojas, Mvz. MsC. Celso Zapata Coacalla, por sus conocimientos, dedicación, interés, tiempo y valiosa ayuda para la elaboración de esta investigación.

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. <i>Lugares de recolección de muestra sanguínea</i>	48
Tabla 2. <i>Listado de primers del gen IRF4</i>	49
Tabla 3. <i>Adición de reactivos para preparación de adn con grupo de primers</i>	52
Tabla 4. <i>Amplificación de primers por PCR para bibliotecas</i>	53
Tabla 5. <i>Proceso de digestión parcial de amplicones mediante PCR</i>	55
Tabla 6. <i>Proceso de purificación y ligación de adaptadores</i>	55
Tabla 7. <i>Ligación de adaptadores con amplicones mediante PCR</i>	56
Tabla 8. <i>Proceso de amplificación de librería por PCR</i>	57
Tabla 9. <i>Dilución de biblioteca amplificada</i>	59
Tabla 10. <i>Adición de reactivos para la amplificación de plantilla</i>	60
Tabla 11. <i>Adición de reactivos para la solución melf-offTM</i>	64
Tabla 12. <i>Adición de reactivos en la tira de 8 pocillos</i>	65
Tabla 13. <i>Número de variantes encontradas en alpacas de color blanco, café y negro</i>	71
Tabla 14. <i>Similitud nucleotídica del IRF4 en alpacas.y secuencias ortologas</i>	73
Tabla 15. <i>Número de variantes encontradas en exones en 210 alpacas</i>	74
Tabla 16. <i>Número de variantes encontradas en intrones en 210 alpacas</i>	75
Tabla 17. <i>Análisis de asociación de alpacas de color blanco y alpacas de color</i>	76

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. <i>Diagrama de trabajo para la creación de la librería.</i>	33
Figura 2. <i>Diferentes pasos de un PCR por emulsión.</i>	35
Figura 3. <i>PCR por emulsión Onetouch™</i>	35
Figura 4. <i>Enriquecimiento de perlas mediante imanes.</i>	36
Figura 5. <i>Enriquecimiento automatizado Onetouch Es™</i>	37
Figura 6. <i>Sistema de Secuenciación Ion-Torrent.</i>	38
Figura 8. <i>Flujograma de extracción de ADN.</i>	46
Figura 9. <i>Flujograma de secuenciación de ADN.</i>	46
Figura 10. <i>Flujograma de análisis de datos de Ion Torrent.</i>	46
Figura 11. <i>Fenotipo de color de fibra de alpacas.</i>	47
Figura 12. <i>Obtención y almacenado de muestras sanguíneas.</i>	48
Figura 13. <i>Proceso de extracción de ADN.</i>	51
Figura 14. <i>Resultado de ejecución de secuenciación de Ion Torrent S5.</i>	52
Figura 15. <i>Unión de pool de primers con ADN</i>	53
Figura 16. <i>Amplificación de primer mediante PCR.</i>	54
Figura 17. <i>Purificación de librerías</i>	57
Figura 18. <i>Cuantificación de librerías mediante flurómetro Qubit™.</i>	59
Figura 19. <i>Proceso de llenado de filtro de reacción Ion Onetouch™.</i>	61
Figura 20. <i>Ejecución del equipo Ion Onetouch™.</i>	61
Figura 21. <i>Tubo de recuperación con esferas iónicas de plantilla positiva.</i>	62
Figura 22. <i>Lavado de partículas de esferas iónicas de plantilla positiva.</i>	63
Figura 23. <i>Tira de 8 pocillos del Onetouch™ Es.</i>	65
Figura 24. <i>Ejecución de onetouch™.</i>	66
Figura 25. <i>Cargado de muestra en el chip 520™ para la secuenciación.</i>	67
Figura 26. <i>Ejecución del secuenciador ion torrent.</i>	68
Figura 27. <i>Porcentaje de variantes encontradas en 210 Alpacas</i>	71

ANEXOS

Anexo 1. <i>Tabla con el gen IRF4 en alpacas marcadas con primers</i>	102
Anexo 2. <i>Tabla de datos de alpacas de color blanco</i>	106
Anexo 3. <i>Datos de alpacas de color negro</i>	112
Anexo 4. <i>Datos de alpacas de color marrón</i>	117
Anexo 5. <i>Figura de porcentaje de variantes en alpacas de color de fibra blanco</i>	120
Anexo 6. <i>Figura de porcentaje de variantes en alpacas de color de fibra negro</i>	120
Anexo 7. <i>Figura de porcentaje de variantes en color de fibra marrón</i>	121
Anexo 8. <i>Tabla de exones e intrones en alpacas de color blanco</i>	121
Anexo 9 <i>Tabla de exónes e intrones en alpacas de color negro</i>	122
Anexo 10. <i>Tabla de exónes e intrones en alpacas de color marrón</i>	123
Anexo 11. <i>Tabla de exónes e intrones en alpacas en el total de alpacas estudiadas</i>	124

LISTADO DE ABREVIATURAS

<i>3'UTR:</i>	Región intrónica es no traducibles del gen
<i>5'UTR:</i>	Regiones exónica traducibles del gen
<i>A:</i>	Adenina
<i>ABSENT:</i>	Variante ausente
<i>ADN:</i>	Ácido desoxirribonucleico
<i>ARN:</i>	Ácido ribosómico
<i>ASIP:</i>	Proteína de señalización de aguti
<i>C:</i>	Citosina
<i>CICAS:</i>	Centro de investigación en camélidos sudamericanos
<i>SNPc:</i>	Polimorfismo de nucleótido en región codificante
<i>DCT:</i>	Tautomerasa de dopacromo
<i>DEL:</i>	Delección
<i>G:</i>	Guanina
<i>GWAS:</i>	Estudio de asociación de todo el genoma
<i>SNPg:</i>	Polimorfismo de nucleótido simple genómico
<i>INS:</i>	Variante de inserción
<i>IRF:</i>	Factores regulador del interferón
<i>IRF4:</i>	Factores regulador del interferón 4
<i>SNPi:</i>	Polimorfismo de nucleótido simple intrónico
<i>MATP:</i>	Proteínas transportadoras asociadas a membrana
<i>MITF:</i>	Factor de transcripción inductor de melanocitos
<i>PNM:</i>	Polimorfismo multinucleótido
<i>MSH:</i>	Hormona estimulante de los melanocitos
<i>NGS:</i>	Secuenciación de próxima generación
<i>PCR:</i>	Reacción en cadena de la polimerasa
<i>SNPr:</i>	Polimorfismo de nucleótido en región reguladora
<i>SNP:</i>	Polimorfismo de nucleótido simple
<i>T:</i>	Timina
<i>TYR:</i>	Tirosina
<i>TYRP1:</i>	Proteína relacionada con tirosinasa 1
<i>FAO:</i>	Organización de las naciones unidas para la alimentación y la agricultura

RESUMEN

Estudios funcionales realizados en células de melanocitos humanos y de ratón revelaron que el gen IRF4 está directamente involucrado en la regulación de la expresión de melanina, lo que sugiere una función clara en la pigmentación de melanocitos. El gen IRF4 no se ha analizado hasta ahora en las poblaciones de camélidos sudamericanos para evaluar si algunos de estos sitios de variación a lo largo del gen IRF4 pueden estar asociados con la pigmentación de la fibra. Los objetivos del estudio fueron evaluar las regiones codificadoras y no codificadoras e identificar variaciones asociadas con el fenotipo de color de pelaje en 210 muestras, 83 alpacas color blanco, 17 alpacas color negro y 53 alpacas color marrón mediante la secuenciación de ADN. Se secuenció el gen IRF4, encontrándose 220 variantes, de las cuales se identificó 106 variaciones, 28 SNPs en la región exónica y 78 SNPs en la región intrónica. Se realizó un análisis de asociación de alpacas de color de fibra blanca y de color, encontrándose 2 SNPs intrónicos fuertemente asociados con el color de capa en el intrón 6, en las ubicaciones c.17381093 con cambio en A>T con un valor $P \leq 0.000003685$ y c.17381207 con cambio en T>C con un valor $P \leq 0.00002506$. Concluimos que el gen IRF4 está relacionado con el fenotipo de color de manto en alpacas.

Palabras claves: Color de manto en alpacas, polimorfismo de nucleótido simple, región exónica, región intrónica, inserciones, deleciones, variantes genéticas

INTRODUCCIÓN

La crianza de alpacas, tiene una gran importancia para el desarrollo de la población alto andina en nuestro país, por su adaptación a condiciones medioambientales difíciles y a la proporción de recursos valiosos como fibra, carne y transporte (Vidal, 1996). El gen *del factor regulador de interferón 4 (IRF4)*, está asociado principalmente con el desarrollo y la respuesta inmune y expresada exclusivamente en células del sistema inmune y cepas melanocíticas en humanos (Vidal, 1996 y Laino et al., 2018). Aunque muchos estudios han asociado al gen *IRF4* con diversas afecciones, como el melanoma y la leucemia linfocítica crónica, estudios de asociación del genoma identificaron que un alelo intrónico está asociado con la variación fenotípica en la pigmentación de piel y del cabello (Gathany et al., 2009; Laino et al., 2018 y Jacobs et al., 2015). Los resultados en células melanocíticas humanas y de ratón revelaron que este SNP está directamente involucrado en la regulación de la expresión del gen *IRF4*, lo que sugiere una función clara en la pigmentación de melanocitos, a pesar de estos hallazgos, la diversidad de las regiones reguladoras y de codificación de *IRF4* no se han analizado hasta ahora en camélidos sudamericanos, (Praetorius et al., 2013 y Sturm, 2009). El uso de tecnologías de genotipado de alto rendimiento, combinado con nuevos enfoques bioinformáticos, tiene un gran potencial para identificar nuevos sitios de variación relacionados con las características de pigmentación animal (Liu et al., 2013). Esta especie nos ofrece la diversidad de colores en fibra que van desde el color blanco hasta el color negro, constituyendo un recurso genético valioso para la conservación y formación de rebaños de alpacas de color (Bustinza y Apaza, 1990). El descubrimiento y análisis de genes candidatos asociados al color del pelaje han llevado a una mejor comprensión del mecanismo de pigmentación en los mamíferos (Almathen et al., 2018). Se han identificado más de 150 genes asociados al color del pelaje en mamíferos con o sin interacciones epistático (Cieslak et

al., 2011). Dentro de ellos, el gen *IRF4* participa en la biosíntesis de melanina (Praetorius et al., 2013). Las variaciones en sus regiones reguladoras afectan la expresión y disponibilidad de este factor de transcripción, sin embargo, el conocimiento sobre la regulación transcripcional en los melanocitos y cómo estos procesos influyen en la pigmentación sigue siendo limitado (Visser et al., 2014). Es de gran relevancia no solo por la necesidad de la biología molecular de la pigmentación de la piel, sino por la importancia que tiene estas variaciones en el gen *IRF4*, en el contexto del uso que se le podría dar en la producción de fibra, con el fin de establecer una adecuada selección los caracteres productivos.

El objetivo de este estudio fue analizar las variantes genéticas asociadas con el color de pelaje blanco marrón y negro con el gen *IRF4* candidato

CAPÍTULO I

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

1.1. Desarrollo del problema

La fibra de la alpaca, conocida como ligera, cálida y resistente, tiene un valor económico considerable y se ha convertido en un buen modelo para estudiar los genes del color del pelo de los animales (Gregor., 2006).

El gen del *factor regulador de interferón 4 (IRF4)*, es miembro de la familia de factores reguladores de interferón (*IRF*), un grupo de factores de transcripción que se unen al ADN. El gen *IRF4* está asociado principalmente con el desarrollo y la respuesta inmune, expresada en células del sistema inmune y cepas melanocíticas en humanos (Vidal., 1996 y Laino et al., 2018).

Aunque muchos estudios han asociado al gen *IRF4* con diversas afecciones, como el melanoma y la leucemia linfocítica crónica, estudios de asociación del genoma identificaron que un alelo intrónico está asociado con la variación fenotípica en pigmentación de piel y de cabello (Sulem et al., 2007; Liu et al., 2010; Eriksson et al., 2010; Jacobs et al., 2015; Liu et al., 2015 y Han et al., 2008).

En estudios de células melanocíticas humanas y de ratón revelaron que este SNP está involucrado en la regulación de la expresión de *IRF4*, lo que sugiere una función clara en la pigmentación de melanocitos (Praetorius et al., 2013 y Sturm. 2009).

El gen *IRF4* no se ha analizado hasta ahora en las poblaciones de camélidos sudamericanos, para evaluar si algunos de estos sitios de variación a lo largo del gen puedan estar asociados con la pigmentación de la fibra.

1.1.1. Problema general

- ¿Existirán variantes genéticas del gen *IRF4* en alpacas asociadas a fenotipos de color fibra?

1.1.2. Problemas específicos

- ¿Existirán variantes del gen *IRF4* asociadas al color de fibra en alpacas mediante el tipo de variante polimórfica?
- ¿Existirán variantes del gen *IRF4* asociadas al color de fibra en alpacas mediante número de variantes encontrados en intrones?
- ¿Existirán variantes del gen *IRF4* asociadas al color de fibra en alpacas mediante número de variantes encontrados en exones
- ¿Existirán variantes del gen *IRF4* asociadas al color de fibra en alpacas mediante análisis de asociación de variantes con fenotipos de color?

1.2. Objetivos

1.2.1. *Objetivos generales*

- Determinar las variaciones del gen *IRF4* asociadas con fenotipos de color de fibra en alpacas.

1.2.2. *Objetivos específicos*

- Evaluar las variantes del gen *IRF4* asociadas al color de fibra en alpacas mediante el tipo de variante polimórfica.
- Describir las variantes del gen *IRF4* asociadas al color de fibra en alpacas mediante número de variantes encontrados en exones.
- Identificar las variantes del gen *IRF4* asociadas al color de fibra en alpacas mediante número de variantes encontrados en intrones.
- Analizar las variantes del gen *IRF4* asociadas al color de fibra en alpacas mediante análisis de asociación de variantes con fenotipos de color.

1.3. Hipótesis

1.3.1. *Hipótesis general*

- Ho: No existen variantes del gen *IRF4* asociadas con fenotipos de color de fibra en alpacas.
- Ha: Existen variantes del gen *IRF4* asociadas con fenotipos de color de fibra en alpacas.

1.3.2. *Hipótesis específica*

- Existen variantes del gen *IRF4* asociadas al color de fibra en alpacas mediante el tipo de variante polimórfica.
- Existen variantes del gen *IRF4* asociadas al color de fibra en alpacas mediante número de variantes encontrados en exones.
- Existen variantes del gen *IRF4* asociadas al color de fibra en alpacas mediante número de variantes encontrados en intrones.
- Existen variantes del gen *IRF4* asociadas al color de fibra en alpacas mediante análisis de asociación de variantes con fenotipos de color.

1.4. Justificación

El gen *IRF4* participa en la biosíntesis de melanina, dado que su producto es un factor de transcripción y en vista de la influencia que juegan los elementos reguladores en la pigmentación animal, es posible que esta molécula tenga funciones aún no establecidas en la biología de los melanocitos (Praetorius et al., 2013 y Sturm, 2009).

Las variaciones en sus regiones reguladoras afectan la expresión y disponibilidad de este factor de transcripción (por ejemplo, influir en la interacción de *MITF* u otros factores de transcripción con la región reguladora del gen *IRF4*) y la regulación de la expresión del gen diana se vería alterada (Praetorius et al., 2013; Song et al., 2018 y Chhabra et al., 2018). Sin embargo, el conocimiento sobre la regulación transcripcional en los melanocitos y cómo estos procesos influyen en la pigmentación sigue siendo limitado (Visser et al., 2014).

El uso de tecnologías de genotipado de alto rendimiento, combinado con nuevos enfoques bioinformáticos, tiene un gran potencial para identificar nuevos sitios de variación relacionados con las características de pigmentación animal (Alvarado et al., 2020), que pueden contribuir por ejemplo, a predecir características fenotípicas, útiles en la mejora genética en camélidos sudamericanos, es de gran importancia saber la biología molecular de la pigmentación de la piel de los camélidos sudamericanos, para poder saber el poder discriminante entre cada uno de los tipos de fibra de color que poseen (Gregor., 2006).

Es de gran relevancia no solo por la necesidad de la biología molecular de la pigmentación de la piel, sino por la importancia que tienen estas variaciones genéticas del gen *IRF4*, en el contexto del uso que se le podría dar en la producción de fibra, con el fin de establecer una adecuada selección los caracteres productivos.

CAPÍTULO II

MARCO TEÓRICO

2.1. Antecedentes de la investigación

Adhikari et al. (2016) reportaron una exploración de asociación del genoma completo en más de 6 000 latinoamericanos para detectar características del cabello del cuero cabelludo (forma, color, canas, calvicie) y vello facial (grosor de la barba, cejas, cejas). Adhikari et al, econtraron que el encanecimiento del cabello muestra una asociación significativa en todo el genoma con el SNP rs12203592 en el intrón 4 del *gen del factor regulador del interferón 4*, este SNP también muestra asociación con el color del cabello en su estudio.

Eriksson et al. (2010) realizó un examen de 22 rasgos comunes diferentes en casi 10 000 participantes, ello reveló asociaciones entre varios polimorfismos de un solo nucleótido, verificándose asociaciones de una gran cantidad de genes previamente identificados, con variaciones en el color del cabello, el color de los ojos y las pecas. Encontraron, además, una asociación significativa del intrón 6 rs12203592, del gen *IRF4* con el color del cabello, el color de los ojos y la respuesta de bronceado a la luz solar.

Gathany et al. (2009) realizarom un estudio en 990 casos de linfoma no Hodgkin y 828 controles de un estudio multicéntrico de EE.UU, utilizando medidas de exposición y sensibilidad al sol, mediante entrevistas personales asistidas por computadora. Evaluaron los efectos de las exposiciones al sol en relación con los genotipos *IRF4*, encontrando asociaciones significativas entre *IRF4*, rs12211228 y *NHL* y entre el color de cabello y ojos y linfoma no Hodgkin. El polimorfismo *IRF4* rs12203592 (genotipo CT / TT) se asoció estadísticamente significativamente con el color de los ojos y particularmente con el color del cabello (odds ratio, Rubio Claro = 0.24, intervalo de confianza 95% = 0.11- 0.50, Chi cuadrado total $p = 0.0002$). Los datos respaldan que

los polimorfismos genéticos en el gen regulador de la inmunidad *IRF4* están relacionados tanto con el riesgo de linfoma no Hodgkin como con el color del cabello y otras medidas fenotípicas de sensibilidad y exposición al sol.

Han et al. (2008) llevaron a cabo un estudio de asociación en todo el genoma en varias etapas del color natural del cabello en más de 10 000 hombres y mujeres de ascendencia europea de los Estados Unidos y Australia. Un análisis inicial de 528 173 polimorfismos de un solo nucleótido (*SNP*) genotipados en 2 287 mujeres identificó *IRF4* y *SLC24A4* como loci altamente asociados con el color del cabello, junto con otras tres regiones que abarcan genes de pigmentación conocidos. El gen *IRF4*, el *SNP* rs12203592, se asoció con el color de la piel, el color de los ojos y la respuesta del bronceado de la piel a la luz solar ($p < 0.01$).

Jacobs et al. (2013) Cuantificaron digitalmente el color de la piel en dimensiones de tono y saturación para 5 860 europeos holandeses sobre la base de fotografías de piel de alta resolución. Probó una lista extensa de 14 185 polimorfismos de un solo nucleótido en 281 genes candidatos potencialmente involucrados en la pigmentación de la piel humana para su asociación con fenotipos cuantitativos del color de la piel. Se reveló una asociación confirmatoria para varios genes conocidos del color de la piel, incluidos *HERC2*, *MC1R*, *IRF4*, *TYR*, *OCA2* y *ASIP*. Encontraron que el gen *IRF4* altamente significativo (rs12203592, $b = 0.010$, $SE = 0.002$, $p < 0.01$

Jacobs et al., (2015) Identificaron una asociación significativa en todo el genoma con manchas pigmentadas en tres loci genéticos: *IRF4* (rs12203592, $p < 0.01$), *MC1R* (puntaje de heterocigosidad compuesta, $p < 0.01$, y *RALY / ASIP* (rs6059655, $p < 0.01$). Las señales de asociación observadas en los cuatro loci se replicaron con éxito $p < 0.01$, en una cohorte holandesa independiente $n = 599$. Aunque los cuatro genes se han asociado previamente con la variación del

color de la piel y el riesgo de cáncer de piel, todas las señales de asociación se mantuvieron altamente significativas $p < 0.01$ al condicionar los análisis de asociación en el color de la piel.

Liu et al. (2015) investigaron la genética del color de la piel humana mediante la combinación de una serie de estudios de asociación de todo el genoma en un total de 17 262 europeos con un seguimiento funcional de los loci descubiertos. Dicho trabajo proporcionó la primera evidencia significativa en todo el genoma de que el cromosoma 20q11.22 que alberga el gen *ASIP* se asocia explícitamente con el color de la piel en los europeos. Además, se confirmó que los loci genómicos en 5p13.2 (*SLC45A2*), 6p25.3 (*IRF4*), 15q13.1 (*HERC2 / OCA2*) y 16q24.3 (*MC1R*) están involucrados en la coloración de la piel en los europeos.

Nan et al. (2009) llevaron a cabo un estudio de asociación de genoma completo de varias etapas de la respuesta al bronceado después de la exposición a la luz solar en más de 9 000 hombres y mujeres de ascendencia europea que viven en los Estados Unidos; como resultado de ello, encontraron varios *SNP* que alcanzan el nivel de significación de todo el genoma están ubicados en los loci previamente conocidos como genes de pigmentación o adyacentes a ellos: *MATP*, *IRF4*, *TYR*, *OCA2* y *MC1R*. En general, estos loci relacionados con la capacidad de bronceado son similares a los loci relacionados con el color del cabello previamente informado en el *GWAS* del color del cabello. Encontraron el intrón 4 del gen *IRF4*, estaba fuertemente asociado con fenotipos pigmentarios, como el color del cabello, la capacidad de bronceado y el color de la piel con un $p < 0.01$.

Praetorius et al. (2013) demostraron que los polimorfismos de secuencia vinculados a enfermedades y fenotipos humanos en estudios de asociación de genoma, a menudo afectan a regiones no codificantes. El *SNP* rs12203592 dentro del intrón 4 del *gen que codifica el Factor 4 Regulador de Interferón (IRF4)*, es un factor de transcripción sin papel conocido en la biología de

los melanocitos, este se encuentra fuertemente asociado con la sensibilidad de la piel a la exposición al sol, pecas, ojos azules y cabello castaño. Además con este estudio se demostró que este SNP se encuentra dentro de un potenciador de la transcripción *IRF4* en los melanocitos.

Sturm. (2009) utilizó una combinación de enfoques que incluyen la genómica comparativa de genes candidatos y la identificación de regiones del genoma humano bajo selección positiva, junto con estudios de asociación de alelos específicos y de todo el genoma. Sturm realizó estudios de asociación de todo el genoma para la pigmentación e identificados marcadores de polimorfismo de un solo nucleótido de genes candidatos, *TYR*, *TYRP1*, *OCA2*, *SLC45A2*, *SLC24A5*, *MC1R*, *ASIP*, *KITLG* y *SLC24A4*, *IRF4*, *TPCN2* previamente desconocidos. Sturm encontró que el gen *IRF4* tiene una variación en el color de cabello en el SNP rs12203592 con una variación de C > T encontrándose una frecuencia de SNP de la población china, japonés, africana y europea, concluyendo que, a partir de la culminación de estudios genéticos y funcionales, es evidente que varios genes que afectan la biogénesis del melanosoma o la vía biosintética de melanina, son candidatos para explicar la diversidad observada en la pigmentación humana.

Visser et al. (2015) investigó la regulación transcripcional de *IRF4* en los melanocitos, con un enfoque especial en las diferencias alélicas del potenciador rs12203592. Visser estudió la expresión de *IRF4* y factores de transcripción potencialmente implicados en su regulación transcripcional en muestras de piel epidérmica de donantes de diferentes fenotipos de color de piel y genotipos rs12203592, en melanocitos de piel cultivados derivados de piel de diferente pigmentación, así como en dos líneas celulares de melanoma Visser demostró que el potenciador rs12203592 interactúa físicamente con el promotor *IRF4* y proporcionamos evidencia de una interacción con un elemento regulador adicional potencial en el intrón 7 de *IRF4* , ambas interacciones dependen del genotipo rs12203592.

Zhang et al. (2013) hicieron un resumen del conocimiento actual sobre cómo la variación del ADN, influye en la pigmentación humana, incluida la variación del color del iris, el cabello y la piel. Revisaron el progreso en el campo de la genética de la pigmentación humana, enfocándonos en los genes y los polimorfismos del ADN, descubrieron que están involucrados en la determinación de los rasgos de pigmentación humana, su asociación con enfermedades particularmente cánceres de piel y su poder para predecir el color del ojo humano, el cabello y la piel con potencial utilización en investigaciones forenses. El gen *IRF4* observaron que tiene un nivel de significancia de $p < 0.01$.

2.2. Revisión bibliográfica

2.3. Marco conceptual

2.3.1. Importancia de los Camélidos Sudamericanos.

Los camélidos sudamericanos son una especie de gran importancia económica y sociocultural para el Perú, son un modelo de adaptación fisiológica a las rigurosas condiciones climáticas existentes en las regiones alto andinas, además tienen gran importancia científica y biológica porque representan un recurso genético único (Raggi y German, 1998).

La alpaca y la vicuña tienen una cotización alta en el mercado internacional porque generan productos como fibra fina y carne orgánica de valor nutritivo superior a otras carnes, las pieles y cueros son utilizados en la artesanía de países como Perú y Bolivia (Solís, 2000; Fernández, 1991).

En diversos países como Perú, Bolivia, Argentina y Chile, los camélidos sudamericanos tienen gran importancia en la industrial textil, por el diámetro y producción fibra fina que poseen estos animales (FAO, 2005).

2.3.2. La alpaca

La alpaca (*Vicugna pacos*), se asemeja a su antecesor, la vicuña (*V. mensalis*), en ciertos aspectos morfológicos y de organización social. Existen dos fenotipos: Huacaya, sus formas anatómicas tienden hacia un conjunto más armónico y balanceado, lo que le da un aspecto más robusto que la alpaca Suri, su vellón es esponjoso, compacto, las fibras y las mechas se disponen perpendicularmente a la superficie del cuerpo y se mantienen en esa posición por los rizos que tiene la superficie de la fibra, de superficie áspera y rizos pronunciados, la fibra acepta fácilmente los tintes y el fenotipo Suri, está cubierto de la cabeza a los pies por fibras que cuelgan a lo largo de su cuerpo, sus fibras, son de superficie lisa, es lacia y estas crecen y se mantienen en paralelo a la superficie del cuerpo, es lustrosa y resbaladiza, sin presencia de rizos esta característica hace

que la fibra Suri no pueda absorber fácilmente los tintes, usándose en muchos casos con otras fibras como, la lana de ovino (Solís, 2000).

En el Perú la población nacional actual de alpacas es de 3 685 516, a comparación de los censos de 1994 y 1972 (2 456 642 y 1 978 827 alpacas respectivamente) indican que está incrementando (INEI, 2012).

2.3.3. *Color de capa en mamíferos.*

La importancia del estudio de color de pelaje y fibra de los animales domésticos radica en que regula la temperatura corporal de animales que se desarrollan en zonas áridas tropicales, donde los colores claros reflejan la radiación solar, en cambio, los pelajes oscuros captan mayor fuente de calor, previene de enfermedades de la piel, la pigmentación y pelaje oscuro reduce la presencia del cáncer de ojo y mucosas. Para la identificación y evaluación de razas de animales, los animales de raza pura tienen colores definidos, debido a que los colores uniformes tienen mayor valor en la industria artesanal, los colores naturales de fibra, lana, tienen mayor demanda para la confección de prendas de vestir. El color de pelaje de los animales se utiliza como referencia para determinar las líneas de progenitores denominados como razas marcadas. El color uniforme o entero del pelaje o fibra de los animales produce ciertas expresiones como: belleza, confort, armonía, deleite a la vista, produce un equilibrio psicológico, constituye un aspecto que transforma y embellece todo el ambiente que rodea al hombre (Gallegos, 2005; Caballero de la Calle y Carrión, 1995).

La variación del color de pelaje en los mamíferos, está influenciado también por un gran número de otros genes, por ejemplo, hay cerca de 127 genes identificados que regulan al color de pelaje en ratones, de estos, cerca de 59 genes están relacionados con las mutaciones del color de pelaje en esta especie, que en la actualidad han sido molecularmente clonados (Bennett y Lamoreu, 2003).

Para la expresión del color de pelaje en mamíferos, intervienen diferentes genes que tienen efectos sobre el color, siendo el ratón el mejor mamífero estudiado para determinar el control genético del color de pelaje. En los mamíferos, este mecanismo de regulación genética, es muy parecido a lo que ocurre en el ratón, por ello se considera como un sistema modelo. Se ha determinado que al menos 5 genes participan en la determinación del color de pelaje en ratones como los siguientes:

2.3.4. El sistema pigmentario de mamíferos

La variación del color de la fibra en los mamíferos ha sido de interés para los científicos. La pigmentación en mamíferos tiene muchas funciones, incluida la protección de la luz solar (Hearing, 2000), la selección de pareja (Safran y McGraw, 2004; Protas y Patel, 2008) y la elusión de depredadores (Protas y Patel, 2008 y Slagsvold, 1995). Como las mutaciones de color son fácilmente identificables y generalmente no letales, también es un sistema ideal para estudiar la función e interacciones genéticas. Los estudios de pigmentos en ratones han formado gran parte de la base de nuestro conocimiento sobre la base genética de la variación de pigmentos de mamíferos (Silvers, 1979).

El modelo de ratón ha servido como una plataforma útil para analizar la variación del color del pelo en otras especies, debido a la homología significativa de los genes de pigmentación entre los mamíferos (Steingrímsson et al., 2006).

Se ha demostrado que los genes que se han asociado con fenotipos específicos en ratones producen fenotipos similares en otras especies, por lo tanto, pueden ser útiles cuando se utiliza un enfoque de gen candidato para estudiar el pigmento en otras especies (Jackson, 1997).

2.3.5. *Pigmentación*

La pigmentación de los mamíferos es producida por tipos de células especializadas, melanocitos en el pelo, la piel por melanocitos coroidales y células del epitelio pigmentario retiniano en el ojo. La síntesis del pigmento de melanina en sí tiene lugar en el melanosoma, un orgánulo especializado de la célula de pigmento, que se deriva del lisosoma (Dell'Angelica, 2003; Schiaffino, 2010 y Wasmeier et al., 2008).

La pigmentación ha sido un área fructífera para la investigación genética desde el siglo XIX, cuando los científicos se dieron cuenta de que los ratones con variados colores de pelaje que desarrollaron fenotipos fáciles de rastrear para el análisis genético, obtuvieron gran avance en la genética de pigmentación del pelo (Steingrimsson et al., 2004). Recientemente, se han descubierto muchas variantes genéticas subyacentes a la variación "normal" en la pigmentación humana (Valverde et al., 1995 y Han et al., 2008).

2.3.6. *Síntesis de pigmento.*

La pigmentación del pelo, los ojos y la piel en los mamíferos es generada por los melanocitos y causada por dos biopolímeros diferentes: Eumelanina (pigmentación oscura, marrón-negra, altamente polimerizada) y feomelanina (pigmentación clara, rojo-amarilla, menos polimerizada). La proporción de las dos melaninas determina la aparición de diferentes fenotipos de pigmentación de amarillo a casi negro. La pigmentación está regulada por *MITF*, ya que muchas de las enzimas de los pasos clave en la biosíntesis de melanina, así como los pasos posteriores en el procesamiento y transporte del pigmento, están bajo el control de *MITF* (Dell'Angelica, 2003; Schiaffino, 2010; Wasmeier et al., 2008).

El aminoácido tirosina es convertido por la enzima tirosinasa (regulada por *MITF*) en dopaquinona. Este paso inicial de la síntesis de melanina es también el paso limitante de la

velocidad, ya que ambas melaninas necesitan dopaquinona para la síntesis adicional (Land et al., 2003). Las mutaciones en el gen *TYR* pueden causar trastornos pigmentarios como el albinismo oculocutáneo tipo I (Oetting y King, 1994). Los siguientes pasos de reacción dependen de si se fabrica eufemelanina o feomelanina. Para la eumelanina, dopaquinona se procesa adicionalmente en 5,6-indolquinona que luego se oxida y se polimeriza en eumelanina. La síntesis de feomelanina es diferente, ya que dopaquinona primero reacciona con el aminoácido cisteína para formar cisteinildopa, que luego se oxida más y finalmente se polimeriza en feomelanina (Kondo y Hearing., 2011)

Las enzimas *TYR*, la proteína 1 relacionada con la tirosinasa (*TYRP1*) y la dopacromo tautomerasa están involucradas en la síntesis de eumelanina, mientras que para la feomelanina solo son necesarias *TYR* y cisteína. La cantidad total de pigmento depende de la producción de dopaquinona (que depende de la actividad de *TYR*).

La relación entre eufemelanina y feomelanina depende de tres condiciones: la producción de los isómeros de cisteinildopa, que solo es posible cuando la concentración de cisteína es superior a 0,13 μM . El siguiente paso es la oxidación de cisteinildopa a feomelanina, para lo cual la concentración de cisteinildopa debe ser superior a 9 μM . La eumelanina solo se sintetiza cuando la concentración de cisteína es inferior a 0,76 μM . De lo contrario, la síntesis es impulsada por la cisteinildopa en dirección a la feomelanina (Ito y Wakamatsu, 2008; Land et al., 2003).

2.3.7. Melanocitos

Los melanocitos se desarrollan a partir de células precursoras derivadas de la cresta neural que se originan en el ectodermo embrionario. Durante la neurulación, un grupo de células experimenta una transición epitelial mesenquimal y migra fuera del neuroepitelio. Estas células de la cresta neural, que migran a muchos lugares en el embrión, son multipotentes al principio, pero

se vuelven restringidas por el linaje durante la diferenciación adicional (Betters et al., 2010; Ernfors, 2010).

Las células de la cresta neural se dividen por su distribución regional en cuatro grupos: craneal, sacro, tronco y vagal, con melanoblastos que se originan principalmente de las células de la cresta neural craneales y derivados del tronco (Le Douarin et al., 2004). Durante su migración, los melanoblastos se multiplican en número y comienzan a expresar secuencialmente genes melanogénicos. Los melanocitos se encuentran en la capa basal de la epidermis, donde cada uno de ellos está rodeado por 30 a 40 queratinocitos y juntos forman la unidad de melanina epidérmica (Fitzpatrick y Breathnach, 1963; Jimbow et al., 1976).

Los melanocitos en la epidermis se comunican con los queratinocitos circundantes y los fibroblastos dérmicos a través de factores secretados y también por contactos celulares. El melanocito en sí mismo se controla en crecimiento, actividad y forma a través de hormonas paracrinas y moléculas de adhesión celular. El queratinocito secreta α -MSH (hormona estimulante de melanocitos) cuando la célula está expuesta a la radiación UV. La hormona estimulará el receptor de melanocortina 1 (*MC1R*) en la superficie del melanocito y estimulará la síntesis de melanina (Haass y Herlyn, 2005; Yamaguchi et al., 2007).

Otras proteínas importantes son la proteína P 12 transmembrana y la *MATP* (también conocida como *SLC45A2*), que se cree que están involucradas en el transporte de proteínas desde la sala de emergencias hasta el melanosoma. Se ha informado de un enrutamiento incorrecto de *TYR*, cuando *MATP* está mutado, así como interrupciones en el transporte de *DCT* y *TYRP1*, lo que explica los fenotipos de pigmentación. Además, ambos también son supuestos intercambiadores de protones (Smith et al., 2004). Otro factor importante para la síntesis de melanina es el pH intramelanosómico. La actividad enzimática de *TYR* es mayor cuando el

ambiente es neutral en un pH ácido. Esta observación condujo a la hipótesis de que el pH intramelanosómico es clave en la decisión de si un melanosoma se vuelve feomelanocítico (Ancans et al., 2001; Fuller et al., 2001). Esta idea está respaldada por la observación de que los melanocitos cultivados de piel oscura contienen melanosomas neutros, mientras que los melanocitos cultivados de piel blanca son ácidos (Smith et al., 2004; Watabe et al., 2004). El número de melanosomas y la cantidad de enzimas parecen ser similares en la piel oscura y blanca, pero los primeros presentan una actividad enzimática diez veces mayor (Iozumi et al., 1993). Los melanosomas se mueven de los lisosomas de los melanocitos hacia la membrana plasmática a lo largo de los microtúbulos utilizando proteínas de dineína (Hirokawa y Noda, 2008), mientras acumulan su contenido de melanina. El transporte intracelular está mediado por moléculas de dineína y kinesina en la superficie de los melanosomas (Vancoillie et al., 2000; Watabe et al., 2008). Los melanosomas maduros pierden su actividad de tirosinasa y finalmente son transportados a los queratinocitos circundantes (Schallreuter et al., 1998).

Además del papel en la atracción (por ejemplo, para pájaros de colores) o el camuflaje, el pigmento tiene un papel protector importante (al menos para los humanos) contra la radiación ultravioleta. La piel más oscura (más pigmento) protege contra los efectos del sol. En los queratinocitos, los melanosomas forman una capa supra nuclear alrededor del núcleo y, por lo tanto, lo protegen de la radiación ultravioleta rica en energía (Kobayashi et al., 1998).

2.3.8. Melanocitos en el folículo piloso.

Además de su ubicación en la piel, los melanocitos también se encuentran en el bulbo de cada pelo. La proporción entre melanocitos y queratinocitos en el pelo es de 1:5 y, por lo tanto, más densa que en la epidermis, donde es de 1:30 a 1:40 (Jimbow et al., 1976; Slomkowski et al., 2005). El proceso de pigmentación del pelo es el resultado de la interacción de los melanocitos

foliculares que producen el pigmento, la transferencia del pigmento a los queratinocitos y la formación de un pelo pigmentado. Se supone que el transporte de la melanina hacia los queratinocitos en el tallo del cabello en crecimiento funciona de manera similar que en la piel y está mediado por el receptor PAR-2. Los melanosomas y las células pigmentarias en el bulbo capilar son más grandes que los de la epidermis (Commo y Bernard, 2000; Slominski et al., 2005; Tobin, 2011). Las diferencias en el color del pelo pueden explicarse por la cantidad y la proporción de feomelanina amarillo-rojo y eumelanina negro-marrón (Ito y Wakamatsu, 2011).

La síntesis de melanina en el cabello es similar a la epidermis y bajo el control de las moléculas de señalización y las hormonas secretadas por las células circundantes, a saber, queratinocitos, células endoteliales y fibroblastos. Mientras que los melanocitos epidérmicos son células de larga vida, los melanocitos del folículo piloso mueren al final de cada ciclo capilar, que dura de 3 a 8 años. El proceso de melanogénesis solo está activo durante la fase de crecimiento del cabello (etapa anágena). La producción de pigmento se apaga durante la fase de regresión (etapa de catágeno) y los melanocitos diferenciados en el bulbo piloso entran en apoptosis. La melanogénesis está completamente ausente en la fase de reposo (etapa telógena). Los melanocitos en el bulbo piloso se reponen del grupo de células madre de melanocitos en el bulbo piloso. (Commo y Bernard, 2000; Nishimura, 2011; Tobin, 2011).

2.3.9. Polimorfismo genético: importancia y aplicaciones

En esencia, un polimorfismo (SNP) hace referencia a la existencia de múltiples alelos de un gen y es considerado como tal cuando la frecuencia de uno de los alelos en la población es superior al 1. Aquellos polimorfismos que afectan a la secuencia codificante de una enzima o a las regiones que regulan su expresión, producen cambios importantes en la estructura de la proteína o

en el mecanismo de regulación de su expresión; pudiendo afectar directamente al funcionamiento de la enzima (Hattori, 2005).

Aproximadamente el 99.9% de la secuencia del ADN de dos individuos diferentes es la misma. Una proporción significativa de las diferencias encontradas en los individuos, es decir, sus diferencias fenotípicas y/o susceptibilidades a ciertas enfermedades, radica en el 0.1% de variación; a este tipo de variaciones genéticas se les conoce como polimorfismos genéticos, los cuales representan diferentes formas en las secuencias de ADN. El estudio de estas variaciones tiene diversas aplicaciones en el campo de la medicina, así como en el desarrollo de investigaciones biológicas y de su evolución (Caratachea, 2007).

2.3.10. Polimorfismo de nucleótido simple (SNP)

Se conoce la existencia de aproximadamente 10 millones de SNPs, que consisten en una variación en la secuencia de ADN que afecta a una sola base (Adenina (A), Timina (T), Citosina (C) o Guanina (G)) de una secuencia del genoma. Sin embargo, algunos autores consideran que pequeñas inserciones y deleciones (INDELS) pueden ser consideradas también como SNP. Cabe mencionar que la variabilidad fenotípica de cada individuo, así como la susceptibilidad o la resistencia individual a distintas enfermedades, radica principalmente en los genotipos presentes en los SNPs (Hattori, 2005).

En las poblaciones, este tipo de alelos se clasifican en alelo principal “silvestre o salvaje” y el alelo secundario “alelo minoritario o mutante”, clasificación basada en la frecuencia observada en las poblaciones. Por tanto, un individuo puede tener uno de estos tres genotipos: homocigoto para el alelo más frecuente, heterocigoto, u homocigoto para el alelo menos frecuente. Los SNPs pueden estar presentes en regiones codificantes y provocar un cambio en un aminoácido denominándose “no sinónimos”, estas modificaciones pueden generar un cambio en la estructura

cuaternaria de las proteínas (estructura tridimensional) a la que codifican que puede conllevar cambios en las propiedades funcionales de la proteína (Sunyaev et al., 2000; Botstein et al., 2003).

Otro tipo de SNPs son los llamados “sinónimos” (o silenciosos) los cuales no alteran la secuencia de aminoácidos. Sin embargo, se ha descrito que algunos de estos polimorfismos pueden tener consecuencias funcionales por algún tipo de mecanismo aún desconocido (Duan et al., 2003). Según su localización en el genoma, los SNPs se clasifican en: iSNP, si están localizados en regiones intrónicas; cSNP, localizados en regiones codificantes (exones); rSNP, localizados en regiones reguladoras; y gSNP, si están localizados en regiones intergenómicas. Los cSNP pueden ser sinónimos (sSNP) o no sinónimos (nsSNP) (Cargill et al., 1999).

Dependiendo de la región donde se localicen, pueden afectar a la región promotora del gen, influenciando la actividad transcripcional del gen (modulando la unión de factores de transcripción) en el caso de los rSNP; o bien afectar a intrones que modulan la estabilidad de la proteína, como es el caso de los iSNP (Lin et al., 2003; Betticher et al., 1995).

2.3.11. Los polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) del gen IRF4 vinculados a fenotipos específicos

En los estudios de asociación de todo el genoma, los polimorfismos a menudo se encuentran en regiones del genoma no codificantes. A diferencia de las variantes de codificación que afectan la función de la proteína, estos SNPs no codificantes, son más complicados de caracterizar funcionalmente (Edwards et al., 2013).

El SNP rs12203592 está ubicado en el intrón 4 del gen del factor regulador de interferón 4 (*IRF4*) en humanos, que codifica un miembro de una familia de factores de transcripción de unión a ADN de hélice-bucle-hélice involucrados en la regulación aguas abajo de la señalización de interferón. Los *IRF* se asocian principalmente con el desarrollo y la respuesta del sistema

inmunitario (Paun y Pitha, 2007). El gen *IRF4* se expresa predominantemente en linfocitos, macrófagos, células B y células dendríticas, pero también en linajes melanocíticos (Gualco et al., 2010).

La implicación de este gen se ha descrito en varios tipos de linfoma y leucemia humana (Gualco et al., 2010), incluida la leucemia linfoblástica aguda infantil en humanos (Do et al., 2010), pero también en enfermedades no hematopoyéticas (Gualco et al., 2010). *IRF4* está implicado en la pigmentación a través de la asociación de variantes de ADN ubicadas fuera de este gen, particularmente con pecas en humanos (Sulen, 2007). En sucesión, se descubrió que el SNP intrónico rs12203592 estaba fuertemente asociado con el cabello, los ojos, el color de la piel, la respuesta al bronceado y el recuento de nevus (Han et al., 2008; Nan et al., 2009). Este SNP no codificante también se identificó como asociado con Leucemia linfoblástica infantil (específica para hombres) y en ese estudio se dio la primera evidencia de que rs12203592 se encuentra dentro de un elemento regulador, que controla la expresión de *IRF4* a través de la unión del factor de transcripción *TFAP2α* (Do et al., 2010).

En las células B de linfoma de Burkitt (Raji), las células de riñón embrionario humano HEK293T y en las células suprarrenales humanas NCI-H295R, se demostró que la región rs12203592 que contiene el alelo C se une fuertemente al factor de transcripción *TFAP2α* y reprime la actividad del promotor *IRF4*, mientras que el rs12203592 y la región con el alelo T se une a *TFAP2α* con menos afinidad y tiene un efecto menos represivo sobre la expresión de *IRF4* (Do et al., 2010). Más recientemente se demostró que en los melanocitos de la piel, rs12203592 se encuentra dentro de un potenciador específico de melanocitos que regula la expresión de *IRF4* (Praetorius et al., 2013).

El factor de transcripción *TFAP2α* se une al elemento potenciador que contiene el alelo C con alta afinidad y, junto con *MITF*, se activa la transcripción de *IRF4*. Cuando el alelo T rs12203592 está presente, la unión de *TFAP2α* se reduce, lo que a su vez conduce a una disminución de la expresión de *IRF4* (Praetorius et al., 2013). Además, se demostró que el fenotipo de pigmentación más ligero asociado con el alelo T rs12203592 es el resultado de la activación alterada de la transcripción de tirosinasa debido a los niveles reducidos de *IRF4* (Praetorius et al., 2013). La diferencia entre los dos estudios, que describe la represión transcripcional (Do et al., 2010) o la activación (Praetorius et al., 2013) podría deberse a los efectos específicos del tipo de células mediados por factores de transcripción distintos de *TFAP2α* y al hecho de que *TFAP2α* puede comportarse como un activador, así como un represor en diferentes contextos (Tellez et al., 2013).

2.3.12. Marcadores Moleculares

Los datos moleculares son una herramienta que permite entender los procesos de la historia genético-evolutiva de las especies. Estos datos son utilizados para elaborar programas de conservación de especies catalogadas como vulnerables o en peligro de extinción (Moritz, 1999).

Un marcador molecular de ADN, es una porción de ADN cuya transmisión de una generación a otra es posible rastrear y se caracterizan por tener una localización cromosómica fija y poder presentar diferentes variantes o alelos que determina su elevado polimorfismo, además se deben identificar de una manera sencilla, rápida y económica y que es una importante herramienta para estudios filogenéticos y búsqueda de genes útiles, análisis de variabilidad genética de poblaciones, establecimiento de mapas genómicos, selección asistida por marcadores, pruebas de paternidad, así como para el diagnóstico de determinadas enfermedades hereditarias (Moritz, 1999).

Un buen marcador debe reunir una serie de características para maximizar su utilidad: buena distribución a lo largo del genoma, alto grado de polimorfismo, la técnica para analizar el marcador debe ser rápida y práctica, y debe poder repetirse con fiabilidad en otros laboratorios. Para elegir el tipo de marcador a utilizar, este debe presentar, además de las características anteriormente descritas, una herencia estable por su tasa de mutación, ser muy reproducible y preciso, presentar pocos alelos “nulos”, una información del genotipo no limitada únicamente a muestras frescas, no requerir grandes cantidades de ADN, y segregarse independientemente de otros marcadores (Aranguren y Jordana, 2001).

2.3.13. *Melanogenia*

El paso limitante de la velocidad en la producción de melanina es catalizado por la enzima tirosinasa dependiente de cobre (*TYR*), que convierte el aminoácido tirosina en dopaquinona. Muchos genes de pigmentación regulan la síntesis, la estabilización, la maduración y la localización de *TYR* activo en los melanosomas donde se produce la melanina. A pH neutro, la dopaquinona se autooxida espontáneamente a través de varios intermedios para formar eumelanina o, en presencia de cisteína o glutatión, se convierte en feomelanina. La eumelanogénesis se controla a través de la vía de señalización del receptor de melanocortina 1 (*MC1R*) en respuesta a α *MSH*, pero cuando el antagonista de *MC1R*, la proteína de señalización agutí (*ASIP*), se une a la feomelanina *MC1R* se produce predominantemente. La señalización de *MC1R* estimula la transcripción del factor de transcripción asociado a microftalmia (*MITF*) (Steingrímsson et al., 1994), que coopera con el factor regulador de interferón 4 (*IRF4*) para activar la expresión de *TYR8*. *TYR* junto con otra enzima melanogénica, la proteína relacionada con la tirosinasa (*TYRP1*), a los melanosomas que brotan del aparato de Golgi. *TYR* tiene una actividad óptima a pH neutro y, por lo tanto, el pH melanosomal está estrechamente regulado. Se proponen varios genes para

regular el pH del melanosoma (por ejemplo, *OCA2*, *SLC45A2*) y por lo tanto, la producción de feomelanina y eumelanina (Steingrímsson et al., 1994).

2.3.14. Gen *IRF4*

Ubicado cerca del complejo mayor de histocompatibilidad, el gen *IRF4* (6p25-p23) pertenece a la familia de factores de transcripción del factor de regulación del interferón (*IRF*) y parece expresarse exclusivamente en células del sistema inmunitario y actúa sobre la respuesta inmune contra las infecciones virales y de melanocitos (Gualco et al., 2010; Gupta et al., 1999).

Expresándose ampliamente, no solo modulan la respuesta al interferón, sino que también participan en el crecimiento celular, la transformación neoplásica, la inducción de apoptosis y el desarrollo de la respuesta inmune mediada por células T, en humanos (Harada et al., 1998).

Los factores de transcripción de la familia *IRF* actúan junto con otros factores de transcripción para la expresión del gen objetivo. Es probable que estos factores interactúen directamente con los modificadores de histonas, controlando el entorno de cromatina de los genes diana. Hacerlo puede afectar no solo los eventos de inicio de la transcripción anteriores, sino también influir en los pasos posteriores, como el alargamiento y la terminación (Ozato et al., 2007).

Aunque no depende de la inducción de interferón, como otros genes de esta familia, *IRF4* se une al elemento de respuesta al estímulo de interferón presente en la región promotora de los genes sensibles al interferón (Escalante y Aggarwal, 1998). *IRF4* se considera un mediador crítico del desarrollo de células dendríticas, mieloides y linfoides (Ozato et al., 2007; Shaffer et al., 2009).

Este gen se ha relacionado con la maduración de células B, con una función crítica en los procesos de cambio de clase mediante recombinación y generación de células plasmáticas a partir de centros germinales y células B de memoria (Klein et al., 2006).

En el mieloma múltiple, *IRF4* funciona como un oncogén, siendo su expresión esencial para el desarrollo de células cancerosas (Shaffer et al., 2008). En algunos casos de mieloma múltiple y linfomas de células T, el gen aún puede translocarse en regiones reguladoras no reguladas de la cadena pesada de inmunoglobulina (Shaffer et al., 2009).

La proteína codificada por *IRF4* comprende una única cadena de polipéptidos, que puede asumir dos posibles isoformas, que consta de 451 (isoforma 1) o 450 (isoforma 2) aminoácidos (Xuan et al., 2013). Los alelos y los genotipos de los polimorfismos de *IRF4* se asociaron con melanoma (Duffy et al., 2010), leucemia linfocítica crónica (Crowther-Swanepoel et al., 2010).

2.3.15. Estructura del gen *IFR4*

IRF4 es una proteína de 51 kDa que consta de 450 aminoácidos en humanos. La proteína *IRF4* contiene un dominio de unión al ADN hidrófilo (residuos 1-134) y un dominio regulador C terminal (residuos 170-450) separados por una región enlazadora flexible (Brass et al., 1999). Los dominios conservados de unión al ADN N-terminal está altamente conservado entre los diferentes miembros de IRF y contiene 5 residuos de triptófano separados por 10-18 aminoácidos que forman un motivo de hélice-giro-hélice (Matsuyama et al., 1995).

El dominio regulador C terminal de *IRF4* consiste en un dominio de activación y un dominio de auto inhibición que regula la unión al ADN y la formación de complejos ternarios. Los residuos 401- 408 del dominio de autoinhibición enmascaran los dominios conservados de unión al ADN a través de interacciones hidrófobas directas (Brass et al., 1996; 1999).

2.3.16. *IFR4* en la pigmentación

Como se mencionó anteriormente, Grossman y sus colegas encontraron una alta expresión de *IRF4* en una línea celular de melanoma y en la piel de ratones recién nacidos (Grossman et al.,

1996). Seis años después de la identificación de *IRF4*, Natkunam y sus colegas (2001) investigaron la expresión de la proteína *IRF4* en un gran número de tumores malignos humanos,

Curiosamente, de los trastornos sólidos, no hematolinfoides y tejidos normales investigados, solo los melanomas malignos mostraron asociación *IRF4* (Natkunam et al., 2001).

Estudios realizados por Sundram y colegas (2003) que investigaron el papel del *IRF4* en los melanomas. Mostraron que la exposición a *IRF4* fue alta en el 86% de los melanomas primarios convencionales y en los melanomas metastásicos.

Los nevus benignos (trastorno generalmente benigno de las células de la piel productoras de pigmento), también mostraron una fuerte expresión de *IRF4* (Sundram et al., 2003).

En 2007, realizaron un estudio de asociación de genoma completo para identificar variantes de secuencia que influyen en el color del cabello, las pecas y la sensibilidad de la piel en las poblaciones de Islandia y Holanda (Sulem et al., 2007).

Los estudios de secuenciación de chips y expresión génica han sugerido que *MITF* puede estar involucrado en la regulación de la expresión génica de *IRF4* (Hoek et al., 2008, Strub et al., 2011). Se analizó el gen *IRF4* en la expresión en ratones que carecen de *MITF*, encontrándose que los melanocitos están ausentes, ello dio como resultando el color de capa blanco en los ratones (Hodgkinson et al., 1993).

En humanos, la variante del gen *IRF4* rs12203592-T, está relacionada con el color del cabello castaño (Sulem et al., 2007).

2.3.17. Secuenciación del ADN

A mediados del siglo XX se hizo cada vez más claro que las secuencias biológicas tenían un papel esencial en los sistemas vivos. El descubrimiento de la secuencia de nucleótidos de una molécula puede proporcionar información sobre la secuencia de aminoácidos de los genes, las

relaciones evolutivas de los genes o genomas, información sobre enfermedades genéticas, etc. El ADN secuenciado puede ser un cromosoma, ADN complementario o cualquier otro tipo de secuencia (Stockholm, 2007).

En los años sesenta, el foco se desplazó al desarrollo de métodos para la secuenciación de nucleótidos. Uno de los primeros proyectos exitosos de secuenciación fue el "extremo adhesivo" de 20 nucleótidos del fago lambda (Wu y Kaiser., 1968). Después de algunos avances iniciales en las técnicas de secuenciación (Sanger et al.,1973; Sanger et al.,1975; Maxam y Gilbert., 1977), el avance se produjo en 1977 cuando Frederick Sanger introdujo inhibidores de terminación de cadena (Sanger et al., 1977). La secuenciación de Sanger funciona mediante la construcción de una molécula de ADN monocatenario en una molécula de ADN bicatenaria mediante la adición de nucleótidos complementarios. La introducción de nucleótidos comienza en una secuencia corta conocida, llamada cebador, que se une al ADN. La enzima ADN polimerasa se usa para incorporar los nucleótidos y alargar la cadena bicatenaria. Esto se hace con una gran cantidad de moléculas de ADN idénticas simultáneamente. Una pequeña porción de un nucleótido carece de la capacidad de unirse, terminando así la cadena. Cuando las secuencias de doble cadena se separan posteriormente, la cadena producida habrá terminado en todos los casos del nucleótido de terminación. Esto se repite para los cuatro nucleótidos. Los fragmentos pueden resolverse según el tamaño en un gel, y la secuencia puede leerse. Al principio, esta técnica podría secuenciar alrededor de 200 nucleótidos, la separación del gel limita la longitud. Hoy en día, las modernas técnicas de secuenciación de Sanger dan secuencias de hasta 1 000 nucleótidos. Una secuencia de nucleótidos obtenida mediante secuenciación a menudo se denomina lectura. Los obstáculos en los primeros días de la secuenciación de Sanger incluyeron el fraccionamiento de los fragmentos de ADN y la separación de una molécula de ADN de doble cadena en una cadena única

secuenciable. El fraccionamiento fue necesario para obtener una muestra pura de una molécula de ADN. Una muestra de fragmento de ADN impuro daría secuencias ambiguas, ya que diferentes secuencias habrían sido "leídas" y mezcladas en el gel. Ambos problemas se resolvieron clonando el ADN como recombinante en un bacteriófago monocatenario (Gronenborn y Messing., 1978; Sanger et al., 1980).

Hubo mejoras adicionales, pero esencialmente la secuenciación de Sanger es el método que todavía se usa en la actualidad. En cambio, las mejoras en robótica y procesamiento de datos son avances que llevaron a la secuenciación a gran escala que vemos hoy ya que la secuencia no es perfecta, los errores de secuencia incluyen confundir un nucleótido con otro, omitir un nucleótido o insertar un nucleótido en exceso, y la incapacidad para determinar el nucleótido correcto (Ewing et al., 1998; Ewing y Green, 1998). Un método común para reducir la tasa de error en una secuencia es repetir la secuencia, por ejemplo, leyendo la secuencia tanto en dirección hacia adelante como hacia atrás. Esto resuelve problemas de secuencia aleatoria pero no dificultades sistemáticas. (Ewing y Green, 1998).

2.3.18. Ion S5 sistema de secuenciación de próxima generación para la secuenciación dirigida

Los sistemas Ion S5™ proporciona el flujo de trabajo de ADN a datos más simple para la secuenciación dirigida con velocidad y asequibilidad. La tecnología Ion Torrent™ ha sido referenciada en más de 3 300 publicaciones hasta la fecha. La tecnología de secuenciación Ion Torrentes un avance reciente, se introdujo la primera tecnología de secuenciación PostLight™ (Ion Torrent). Esta tecnología crea una conexión directa entre la información química y la información digital, permitiendo una secuenciación rápida, simple y masivamente escalable (Metzker, 2010). Utiliza la química de Watson de ácido nucleico simple y la tecnología de semiconductores que utiliza la ley de Moore (Moore, 1965).

El principio de la tecnología de semiconductores Ion Torrent se basa en un proceso bioquímico bien caracterizado, en el que un nucleótido se incorpora en una cadena de ADN por una polimerasa, lo que resulta en una liberación de iones de hidrógeno como subproducto. El dispositivo tecnológico utiliza una matriz de micro pozos de alta densidad; para realizar este proceso bioquímico de una manera masivamente paralela con cada pozo que contiene una plantilla de ADN diferente, debajo de los pozos hay una capa sensible a iones y debajo de eso un sensor de iones patentado. Por ejemplo, si un nucleótido se agrega a una plantilla de ADN y se incorpora a una cadena de ADN y luego se liberará un ion hidrógeno. La carga de ese ion cambiará el pH de la solución y puede ser detectada directamente por el sensor de iones sin escaneo, cámaras y luz. De esta manera, el secuenciador, inunda secuencialmente el chip con un nucleótido tras otro (Sutton et al., 2011).

2.3.19. Preparación de bibliotecas

Consiste en la adición de adaptadores a ambos extremos de cada uno de los millones de fragmentos de ADN a secuenciar (conocidos con el nombre de inserto). Además, en esta etapa, se pueden añadir etiquetas (secuencias establecidas de ADN para diferenciar cada muestra, llamados habitualmente códigos de barra de la muestra, por lo que en un mismo ensayo se pueden combinar múltiples muestras sin riesgo de entrecruzamiento entre las mismas (Yohe y Thyagarajan, 2017).

Los adaptadores son específicos para cada plataforma de secuenciación; se trata de fragmentos de ADN de doble cadena con secuencias consenso, donde se alinean los primers para las etapas de amplificación del templado y los cebadores para la secuenciación propiamente dicha (Rehm et al., 2013).

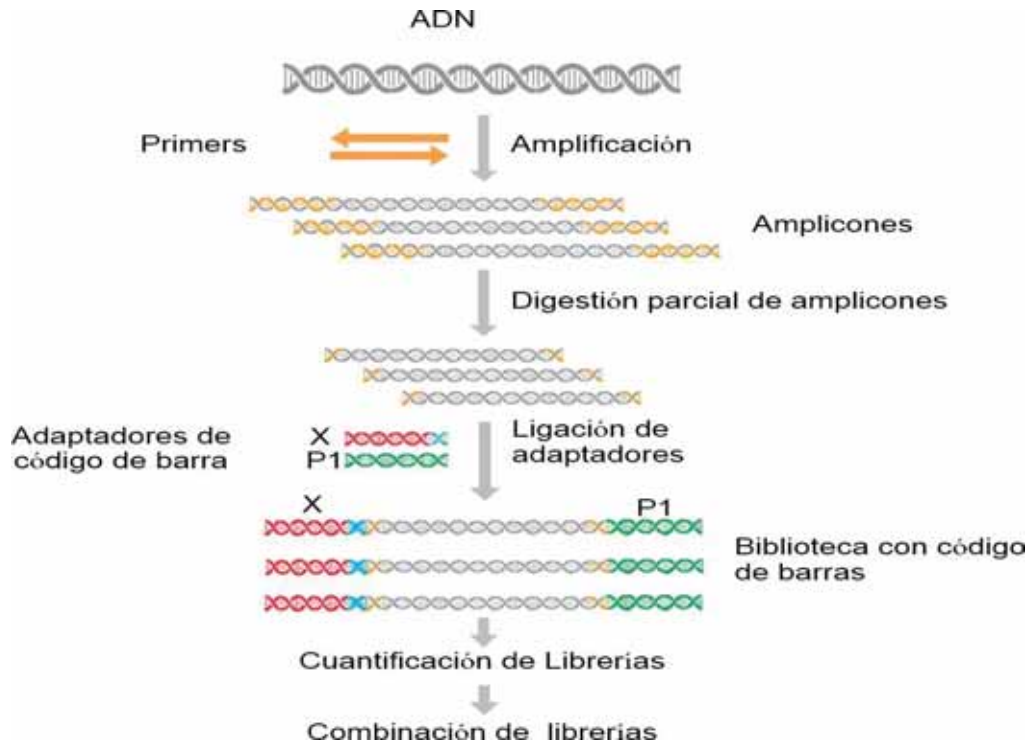


Figura 1. Diagrama de trabajo para la creación de la librería

Nota: Imagen modificada del protocolo Ion AmpliSeq™ ADN preparación de librerías

2.3.20. Amplificación de platilla con sistema ion onetouch 2™

La amplificación de plantilla se realiza por métodos de PCR en emulsión, primero se genera una biblioteca de ADN a través de la fragmentación aleatoria del ADN genómico. Los fragmentos de ADN mono catenarios (plantillas) se unen a la superficie de las cuentas con adaptadores o conectores, y una cuenta se une a un fragmento de ADN único de la biblioteca de ADN (Nakano et al., 2003; Dressman, 2006).

La superficie de las perlas contiene sondas de oligonucleótidos con secuencias que son complementarias a los adaptadores que unen los fragmentos de ADN. Las perlas se compartimentan luego en gotitas de emulsión de agua y aceite, cada una de las gotitas que capturan una perla es un micro reactor de PCR que produce copias amplificadas de la plantilla de ADN individual (Chee et al., 2010; Dressman et al., 2006).

Idealmente, cada vesícula/gotita contiene una esfera, una molécula plantilla mono catenaria, uno de los cebadores unidos a la esfera y todos los demás reactivos necesarios para la reacción de PCR; el segundo cebador permanece en la solución para detectar moléculas unidas a los mismos adaptadores (Buermans y Dunnen, 2014). Por lo tanto, cada vesícula funciona como un micro reactor de PCR aislado que conduce a la generación de numerosas copias de las plantillas unidas que facilitan la detección de la señal (Nakano et al., 2003; Dressman, 2006).

Existen varias ventajas al usar el PCR por emulsión, para el paso de amplificación de plantilla en plataformas basadas en secuenciación de siguiente generación. La amplificación por PCR de bibliotecas de ADN complejas en plataformas basadas en secuenciación de siguiente generación, generalmente se asocia con problemas inherentes. Estos son principalmente de dos tipos: amplificación preferencial de fragmentos cortos y formación de moléculas de ADN quimérico por recombinación de regiones homólogas (Meyerhans et al., 1990).

Estos se vuelven especialmente importantes cuando se utiliza ADN de plantilla de bajo aporte, a menudo el caso en diagnósticos clínicos, ya que requiere un mayor número de ciclos de PCR. El PCR por emulsión es capaz de mitigar estos problemas de manera efectiva al separar las moléculas de la plantilla en numerosos compartimentos, evitando así la competencia de la plantilla y minimizando las posibilidades de recombinación (Williams et al., 2006).

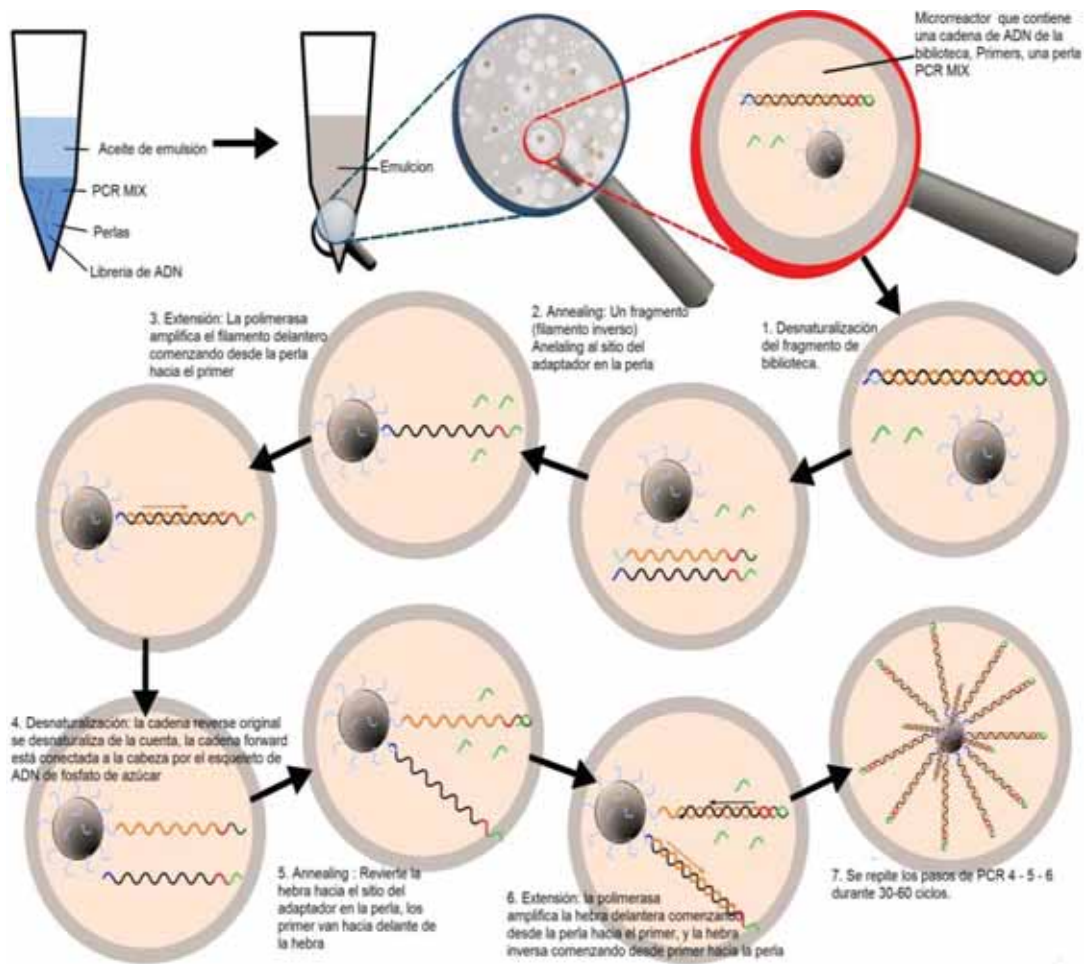


Figura 2. *Diferentes pasos de un PCR por emulsión*

Fuente: (Vierstraete, 2012).

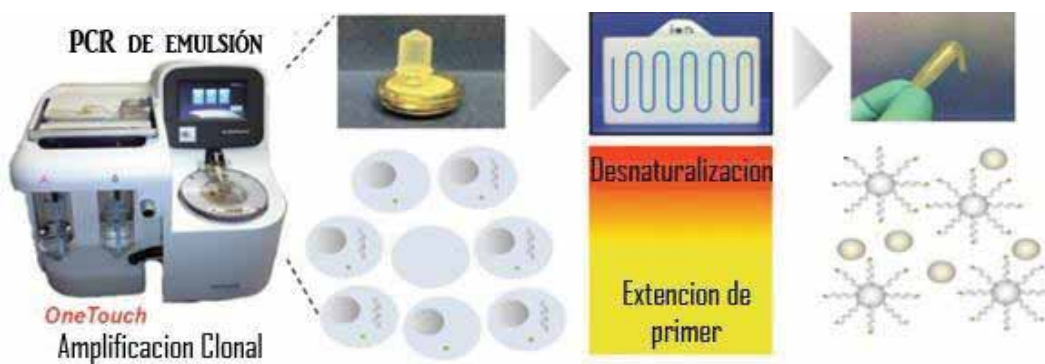


Figura 3. *PCR por emulsión OneTouch™*

Fuente: Kohn et al., (2013).

2.3.21. Enriquecimiento de plantillas positivas de los ISP ion 520™

El enriquecimiento se refiere a un paso de lavado para las perlas, también llamado partículas de esfera iónica (ISP) que elimina los restos de cebadores y el desoxinucleótido trifosfato (dNTP) del proceso de PCR. Para desarrollo de un protocolo de secuenciación, es necesario enriquecer las regiones de interés a la vez que se separa el resto del ADN genómico. A lo largo de los años se han perfeccionado una serie de métodos para aislar positivamente regiones de interés. Estos se podrían englobar en dos grupos mayoritarios: enriquecimiento basado en captura y enriquecimiento basado en PCR (Mamanova et al., 2010).

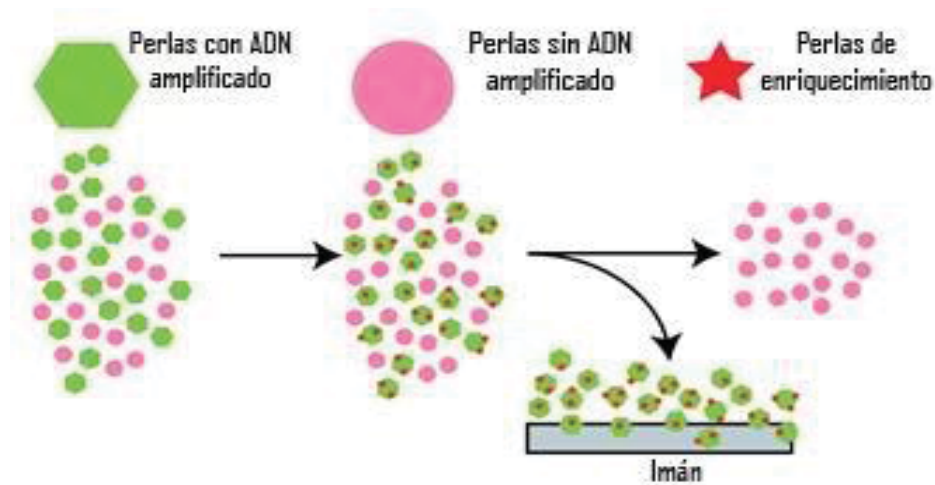


Figura 4. *Enriquecimiento de perlas mediante imanes*

Fuente: (Vierstraete, 2012).

Luego de preparar las bibliotecas con dichos fragmentos, esta se hibrida con sondas de ADN o ARN complementarias a las regiones de interés. En un principio se utilizaron micro matrices donde las sondas con secuencias complementarias se encontraban en una fase sólida, pero posteriormente fueron reemplazadas por sondas en solución líquida, que han ganado en última instancia mayor popularidad (Okou et al., 2007 y Gnirke et al., 2009).

Cabe mencionar que las sondas en solución se encuentran marcadas (con biotina, por ejemplo), por lo tanto, pueden capturarse (con perlas magnéticas, con avidina, por ejemplo), para terminar, descartando todas las secuencias indeseadas que no se han hibridado (Gnirke et al., 2009)

Este método suele ser un poco más costoso y consumir más tiempo, pero tiene la ventaja de ser capaz de enriquecer mayor cantidad de regiones (mejor funcionalidad en exomas o grandes paneles de genes), además de eliminar la amplificación por PCR, un paso que podría introducir errores en la amplificación, ya que las polimerasas habitualmente cuentan con una tasa de error de entre 5×10^{-4} y $5,3 \times 10^{-7}$ bases (Potapov y Ong., 2017).

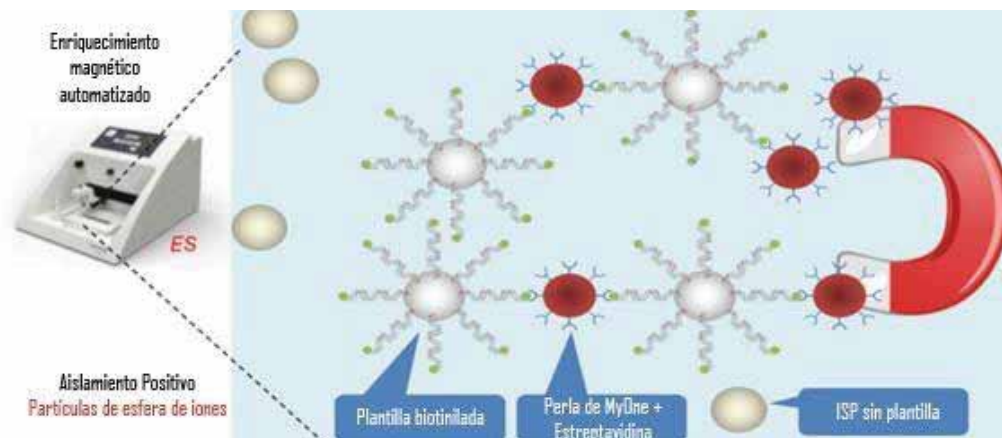


Figura 5. *Enriquecimiento Automatizado OneTouch ES™*

Fuente: Kohn et al., (2013).

2.3.22. Secuenciación con Chip ion 520™

Ion Torrent desarrolló un sistema basado en el uso de la química de secuenciación estándar, pero con un novedoso sistema de detección basado en semiconductores. Este método de secuenciación se basa en la detección de iones de hidrógeno que se liberan durante la polimerización del ADN, a diferencia de los métodos ópticos utilizados en otros sistemas de secuenciación. Un micro pocillo que contiene una cadena de ADN de plantilla para ser secuenciado se inunda con un solo tipo de nucleótido (Rusk, 2011).

Si el nucleótido introducido es complementario al nucleótido principal líder se incorpora en la cadena complementaria en crecimiento. Esto provoca la liberación de un ion de hidrógeno que activa un sensor de iones hipersensibles, lo que indica que se ha producido una reacción. Si las repeticiones de homopolímeros están presentes en la secuencia de plantilla, se incorporarán múltiples nucleótidos en un solo ciclo. Esto conduce a un número correspondiente de hidrógenos liberados y una señal electrónica proporcionalmente más alta (Rusk, 2011). Cuando se incorpora un nucleótido en una cadena de ADN en crecimiento, se libera un H^+ . El H^+ libre produce un cambio en el pH, que es detectado por un sensor en los pozos. Se agrega un nucleótido (A, T, G o C) al chip a la vez, en los pocillos, donde los nucleótidos son complementarios al siguiente nucleótido en la cadena de la plantilla, habrá un cambio en el pH. En los pozos donde no se incorporan nucleótidos, no habrá cambio de pH (Buermans y Den Dunnen 2014).

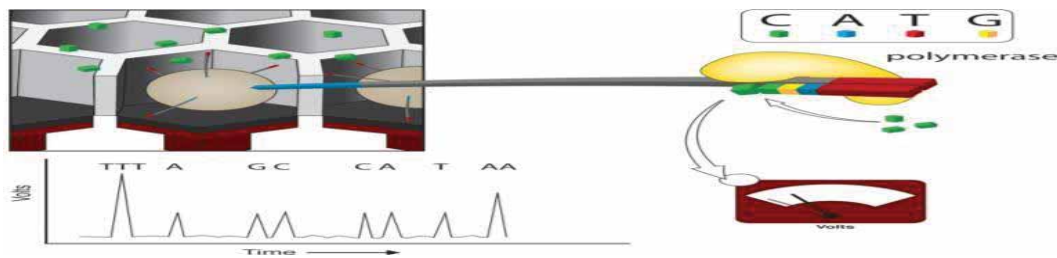


Figura 6. Sistema de secuenciación Ion-Torrent

Fuente: Niedringhaus et al., (2011).

CAPÍTULO III

DISEÑO DE LA INVESTIGACIÓN

3.1. **Ámbito de estudio**

3.1.1. *Ubicación Geográfica*

El trabajo de investigación, se llevó a cabo en:

Centro de Investigación de Camélidos Sudamericanos (CICAS) la Raya de la Universidad Nacional San Antonio Abad del Cusco.

Que está ubicado a 14°28'42,59'' de latitud sur y 71°01'41,55'' de longitud oeste, a una altura de 4120 msnm. (Apaza et al., 2006).

Fundo Chaupi Wasi

Está ubicado en el distrito de Maranganí, provincia de Canchis y departamento de Cusco. Esta ubicado en las coordenadas de Altitud: 4608 m.s.n.m. Latitud Sur: 14°14'24.9'' Longitud Oeste: 070°50'52.2'.

Fundo Oquemarca Phinaya

Está ubicado en la comunidad Phinaya está ubicada al norte del Distrito de Pitumarca y al noreste de la Provincia de Canchis, 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"

CAP. Huaycho Ñuñoa

Está ubicado en el distrito de Nuñoa, Provincia de Melgar y departamento de Puno. Está ubicado en las coordenadas de Altitud: 4316 m.s.n.m. Latitud 14°16'43.5"S y longitud 70°33'02.4" W.

3.1.2. *Duración del estudio*

El estudio se realizó entre los años de 2018 y 2019.

3.2. Materiales de estudio

3.2.1. *Material biológico*

- Muestra de sangre de 210 alpacas de las razas huacaya y suri, de los cuales se obtuvo material biológico de 83 alpacas de color de fibra blanco, 74 alpacas de color de fibra negro y 53 alpacas de color de fibra marrón.

3.2.2. *Materiales para trabajo de campo*

3.2.2.1. Materiales para muestreo de sangre periférica

- Botas de hule.
- Guantes descartables.
- Plumón indeleble.
- Marcador spray.
- Vacutainers estériles.
- Agujas 22x 1½.
- Gradillas con una inclinación de 45°.
- Recipiente para transporte de muestra.
- Algodón.
- Alcohol al 70 %.
- Guantes de exploración.
- Bolsas de plástico.
- Cinta masking.

3.2.3. *Materiales para el trabajo en Laboratorio*

3.2.3.1. Materiales para la extracción y cuantificación de ADN

- Mandil descartable.
- Guantes de nitrilo.
- Barbijo.
- Lentes.
- Cronómetro.
- Puntas descartables de 2, 10, 20, 100, 200, 1000 μ L.
- Tubos de 2 y 1.5 mL.
- Materiales de plástico.
- Reactivos del kit comercial.
- Kit de purificación de ADN genómico: Gene JET Scientific Thermo # K0721, K0722 # - Pub. N. ° MAN0012663.
- Kit de extracción de ADN genómico: Gene JET Whole Blood Genomic DNA #K0781, #K0782 - Pub. N°. MAN0012667.

3.2.3.2. Materiales para la secuenciación de ADN

- Mandil descartable.
- Guantes de nitrilo.
- Cronómetro.
- Puntas descartables de 2, 10, 20, 100, 200, 1000 μ L.
- Tubos de 2 y 1.5 mL.
- Materiales de plástico.
- Barbijo.

- Lentas.
- 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.

3.2.4. Equipo de laboratorio

3.2.4.1. Extracción de tejido sanguíneo

- Congeladora a -20 °C (Thermo Fisher TSX).
- Gradillas de plástico.
- Bolsas de plástico.
- Tubo con 3 mL con EDTA 5.2 mg (anticoagulante).
- Lapicero indeleble.

3.2.4.2. Extracción de ADN

- 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).
- Vórtex (Thermo Scientific™ Agitador vórtex LP).
- Micropipetas de varios volúmenes (Thermo Scientific™ Kits Finnpiipette™ F2 GLP y Eppendorf).

- Termociclador (Thermo Fisher Applied Biosystems).
- Calefactores (OFR11AO 2500W).

3.2.4.3. Cuantificación del ADN

- Vortex (Thermo Scientific™ Agitador vótex LP y USA Scientific).
- Micro centrifuga (mySPIN™ 12 Mini centrifuge – Thermo Fisher).
- Vórtex (USA Scientific).
- Cuantificador del ADN (Qubit™ Fluorometer - Thermo Fisher).

3.2.4.4. Secuenciación de ADN

- 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 (Vórtex LP Thermo Fisher).
- Micro centrifuga (mySPINTM 12 Mini centrifuge – Thermo Fisher).
- Micro centrifuga de chip (Ion Chip Minifuge – Thermo Fisher).
- Micro pipetas (Thermo Scientific™ Kits Finnpipe™ F2 GLP y Eppendorf).
- Material de plástico (puntas, tubos y otros).
- Termociclador (Thermo Fisher Applied Biosystems).
- Calefactores (OFR11AO 2500W).
- Formación de primers (Ion Touch 23 Thermo Scientific™).
- Purificador de primers (Ion Touch E Thermo Scientific™).
- Secuenciador (ION S5™ Thermo Scientific™).

3.2.5. Bioinformática

- Computadora.
- Software.
 - Software Torrent Suite™ v4.4.3.
 - Software Base Calling.
 - Software Mapeo Torrent.
 - Software Torrent Variant Caller.
 - Software PLINK v1.90b4.

3.3. Método de la investigación

3.3.1. Tipo y nivel de investigación

El nivel que se usó en el presente trabajo de investigación fue relacional.

3.3.2. Diseño de investigación

El tipo de diseño fue analítico, descriptivo.

3.3.3. Población de estudio

La población de estudio fue alpacas los fundos alpacas de los fundos Oquemarca (Phinaya), Chaupi Wasi (Marangani) y CAP. Huaycho (Ñuñoa).

3.3.4. Muestra

Se tomaron muestras de 210 alpacas de las razas Huacaya y Suri, 83 alpacas de color blanco, 74 alpacas de color negro y 53 alpacas de color marrón.

El tipo de muestreo fue no probabilístico.

3.3.5. Diseño estadístico

Se realizó el análisis de asociación del gen *IRF4* con alpacas de fibra de color; mediante la prueba de asociación estadística de χ^2 , se determinó si existe asociación del gen *IRF4* y alpacas de color blanco; se determinó mediante p-value, la probabilidad del que el gen *IRF4*, esté presente en alpacas de fibra de color y se ajustó con el tes de corrección de Bonferroni.

Las frecuencias alélicas para las variantes del gen *IRF4* fueron estimadas utilizando los genotipos de los casos y controles, se tomó como control al total de alpacas analizadas y casos a los grupos de color de fibra.

Se compararon las frecuencias alélicas entre casos y controles para determinar el cambio nucleósido existente.

3.4. Evaluación en el laboratorio

3.4.2. Laboratorio CICAS “La Raya”

Se llevó a cabo en el laboratorio de “Genética Molecular”, de la Escuela Profesional de Medicina Veterinaria, en el Centro de Investigación de Camélidos Sudamericanos – “La Raya” la realización de resultados finales de extracción de ADN, PCR a tiempo final y secuenciación del gen.

3.5. Metodología de estudio

3.6. Variables evaluadas en el estudio

3.6.2. Variable independiente

- Fenotipos de color de fibra en alpacas (X).

3.6.3. Variable dependiente

- Secuenciación del gen *IRF4* e identificación de variaciones (Y).

3.6.4. Flujo grama

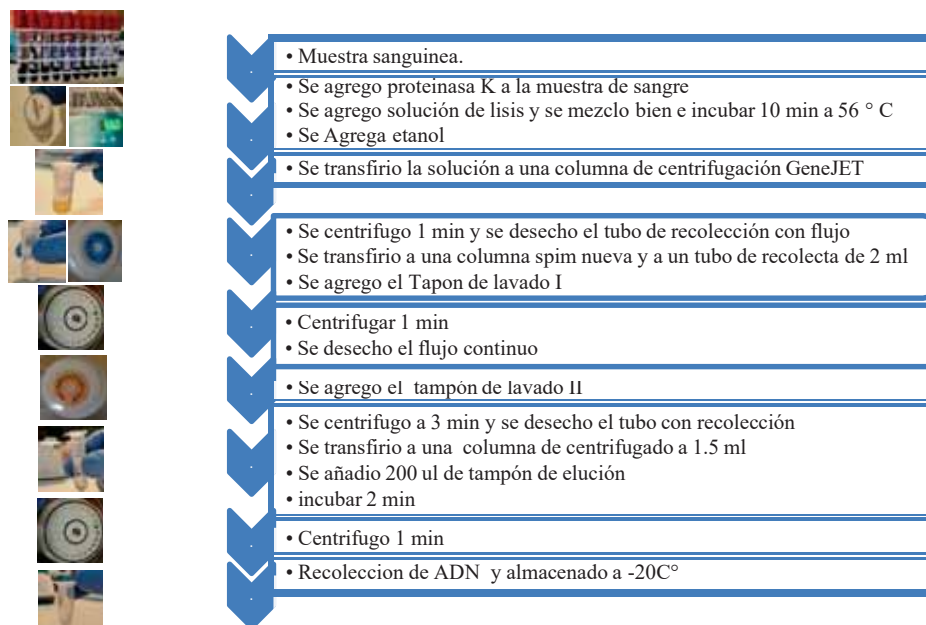


Figura 7. Flujo grama de Extracción de ADN

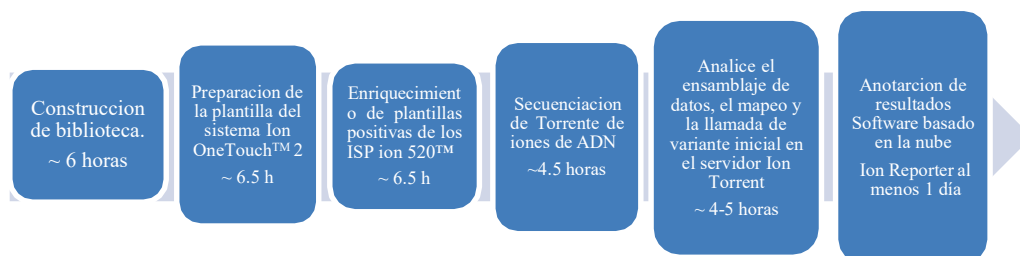


Figura 8. Flujo grama de Secuenciación de ADN

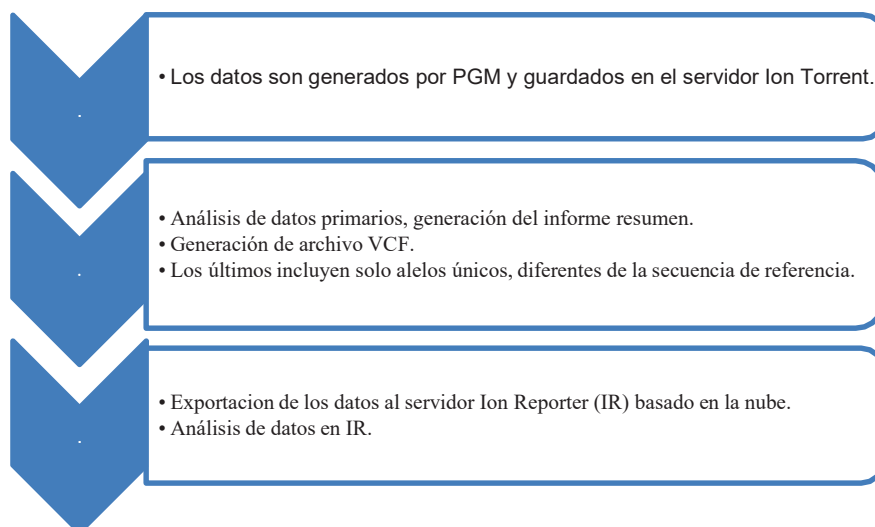


Figura 9. Flujo grama de análisis de datos de Ion Torrent

3.6.5. *Obtención de muestras sanguíneas*

Se recolectaron 210 muestras sanguíneas de alpacas de raza Huacaya y Suri, procedentes del: Fundo CAP Huaycho Fundo, CICAS la Raya, Fundo Chaupi Wasi y Fundo Oquemarca.

Las muestras de sangre fueron obtenidas de la vena yugular de 74 alpacas de color negro, 53 alpacas de color marrón y 83 alpacas de color blanco (Tabla 1), mediante venopunción, usando vacutainers estériles y agujas 22 x 1½ en tubos con anticoagulante de ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) de 2 mg/ml (Montes et al., 1983).

Las muestras se conservaron mediante cadena de frío y fueron trasladadas hasta el laboratorio para ser conservadas a temperaturas de -20 °C, las cuales se mantuvieron congeladas hasta el momento de la extracción de ADN.



Figura 10.

Fenotipo de color de fibra de alpacas realizado en el estudio

Tabla 1.*Lugares de recolección de muestra sanguínea*

Lugares de Muestreo	Fundo Oquemarca	Fundo Chaupi Wasi	Fundo CAP Huaycho	CICAS La Raya	TOTAL
Alpacas Blancas	36	39	6	2	83
Alpacas Negras	23	2	0	37	74
Alpacas Marrón	13	13	13	14	53
TOTAL					210

**Figura 11.** *Obtención y almacenado de muestras sanguíneas***3.6.6. Diseño de primers**

Se diseñó primers para la región codificadora y no codificadora del gen *IRF4*, para ello se utilizó el servicio que ofrece la empresa Thermo Fisher para el diseño de primers compatibles con el kit Ion AmpliSeq. Para el estudio se utilizó 2 pool de genes de 212 amplicones de los cuales se utilizaron 16 primers para la secuenciación (Tabla 2), amplificándose y secuenciándose en el estudio 9 intrones y 10 exones (ver anexo1).

Tabla 2.*Listado de primers del Gen IRF4*

Nº	Primers Forward 5' a 3'	Primers Reverd 3' a 5'	Inicio del Amplicon	Final del amplicon	Tamaño (Pb)
1	GGGATGCGGAAG ATGCTC	CTGAGAAGGTG CCTTCTCTGG	17384474	17384815	341
2	CAGGAAGCCCTA CCTTCTTGG	GCCCTAACACT GTTCTTTCCTTT AGAAATA	17382825	17383117	292
3	GTTTGCCTTGGCT GTTTACTA	AATAATGCCCA AGGGAATTGCA AAAA	17381853	17382220	367
4	CCCTGCAATGTTT AAAGAAGATTCC A	AGCAGGTTCCAC AACTACATGAT CC	17380998	17381367	369
5	CGGTGGAGGCAG ATTAGAGGAA	CATCTGATTCTT CTTTGCAAATA CAGGT	17379044	17379362	318
6	CCTGACAAGAAC TGCTGAGTGT	CCTGGAAACTT TGTTTGCAGAC T	17376866	17377240	374
7	AAACACTCACGT GAGCTGTAATGA	TTTTCCCTCCTCC TTCATTCCTCTC T	17374361	17374735	374
8	CCCTCAAGTGTT GAACTGAAGC	TTGTTCTGGTGT GTTACGAACCT TGAGAAAGTGC	17372259	17372622	363
9	GGCACAAGCATA GAAGGTTCCCT	ATTCCCTCCTTCA AC TGTTTGGAAAG	17379302	17379514	212
10	CGGTAGTAGAGG CAGATGTGGA	TGCCCAGTTAG AG	17377190	17377441	251
11	CCACCCTCCTAC CCAGCTT	GGGCTCAAGGG CATTCTTG	17384865	17385197	332
12	CTGAAGCGGGAT AGGTTGGAAG	CGACTCGGTCT CTCCAAGTTTC	17383225	17383561	336
13	CGCCTCCCTTCTA CAAAACAGT	CCCTACAAAGT GTACAGGATCG T	17382510	17382880	370
14	CCAGTGCCCTCC TTACCATTTT	CAAGAGGTTCC CGAGGAGTTTG	17381205	17381452	247
15	TTCTAGGAAACT TAAAGGAGCCAA ACA	CTGGAGAGAGA CCAGACCTGCA A	17376559	17376918	359
16	TTGAAGAACAAA GGACACAGGAAG GATG	GGTTCTGAACG CCTCTCTTGTG	17374144	17374516	372
Total					5277

3.6.7. *Extracción de ADN*

Se utilizó una alícuota de 200 μL de sangre por muestra de 210 alpacas para la extracción de ADN, en el estudio se utilizó el Kit de purificación de ADN genómico Gene JET Scientific Thermo # K0721, Pub. N° MAN0012663 (Thermo Fisher Scientific Inc, WA, USA).

- Se agregaron 20 μL de Solución de Proteinasa K a 200 μL de sangre completa, y se procedió a la mezcla por vórtice.
- Se agregaron 400 μL de solución de lisis, y se procedió a mezclar bien mediante vórtice o pipeteando para obtener una suspensión uniforme.
- Se procedió a incubar la muestra a 56 °C durante 10 minutos mientras se agitó en vórtex ocasionalmente, hasta que las células estén completamente lisadas, se transfirió la mezcla preparada a la columna de centrifugado.
- Se procedió a centrifugar durante 1 minuto a $6\,000 \times g$ ($\sim 8\,000$ rpm).
- Se desechó el tubo de recolección que contiene la solución de flujo continuo para colocar la columna en un nuevo tubo de recolección de 2 mL (incluido) y procedió a agregar 500 μL de Wash Buffer WBI (con etanol agregado).
- Se procedió a centrifugar durante 1 minuto a $8\,000 \times g$ ($\sim 10\,000$ rpm).
- Se desechó el flujo y colocó la columna nuevamente en el tubo de recolección.
- Se agregaron 500 μL de Wash Buffer II (con etanol agregado) a la columna y se procedió a centrifugar durante 3 minutos a la velocidad máxima ($\geq 20\,000g \geq 14\,000$ rpm), la columna de purificación se colocó nuevamente en el tubo y se volvió a girar la columna durante 1 minuto a velocidad máxima ($\geq 20\,000g$).
- Se agregaron 200 μL de tampón de elución al centro de la membrana de la columna para eluir el ADN genómico.

- Se incubó durante 2 minutos a temperatura ambiente y se procedió a centrifugar durante 1 minuto a 8000g.
- Se desechó la columna de purificación y el ADN purificado, inmediatamente se usó para la secuenciación o se procedió al almacén para próximas utilizaciones a -20 °C.
- La cuantificación de ADN se determinó mediante Qubit® 2.0 Fluorometer, usando Qubit™ dsDNA HS Assay Kit (Invitroge™, Thermo Fisher Scientific Inc., WA, USA).



Figura 12. *Proceso de extracción de ADN*

3.6.8. *Secuenciación de ADN*

Se llevaron a cabo 20 corridas de secuenciación, obtenidas en 210 ciclos con lecturas de pares: 54.60 Gbp con 63 237 090 lecturas que pasan el filtro en la carrera, 1 266 074 880 Tbp con 78 245664 lecturas que pasaron los filtros.

Cada individuo secuenciado presentó un porcentaje diferente de contribuciones de lectura identificadas en la secuenciación, la diversidad del gen *IRF4* se evaluó en todas ellas con un promedio de densidad del 85% en cada chip, obteniendo una buena densidad de partículas de esferas iónicas (Fig. 14).

Se pudo secuenciar un total de 6 662 variantes del gen *IRF4* en 3 fenotipos de color de manto en alpacas de las cuales se obtuvieron, 2 290 variantes para el fenotipo de color de manto

blanco, 728 variantes para el fenotipo de color de manto color negro y 3 644 variantes para el fenotipo de color de manto color marrón.

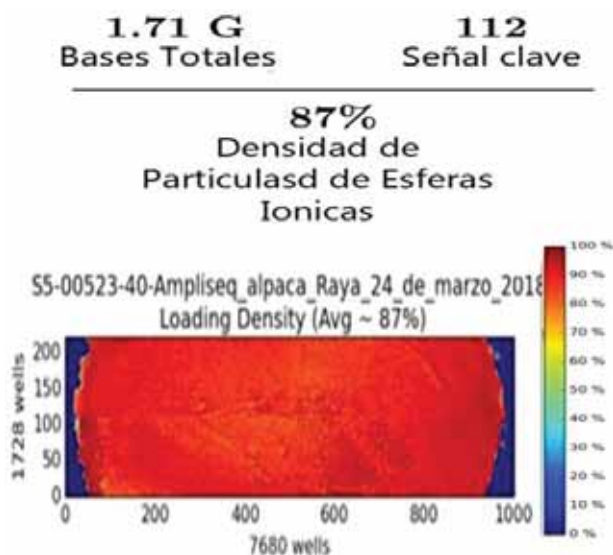


Figura 13. Resultado de ejecución de secuenciación de Ion Torrent S5

3.6.8.1. Preparación de ADN para bibliotecas

A. Proceso de preparación de reacciones de amplificación de ADN

- Se agregaron los siguientes componentes a un solo pocillo de una placa de PCR de 96 pocillos.

Tabla 3.

Adición de reactivos para preparación de ADN con grupo de primers

Componentes	Volumen
Panel de primers	
5X Ion AmpliSeq™ HiFi Mix	4 µL
2X Ion AmpliSeq™ Grupo de Primers	10 µL
ADN (1–100 ng)	≤6 µL
Agua libre de nucleasas	Hasta 20 µL

- Se procedió a mezclar completamente, pipeteando hacia arriba y hacia abajo 5 veces, luego se transfirió las mezclas maestras de la muestra a 2 pocillos de una placa de PCR de 96 pocillos.
- Se transfirió un volumen de 5 μ L de mezcla maestra a 2 pocillos y se agregaron 5 μ L del grupo de primers 1 al primer pocillo y 5 μ L del grupo de primers 2 al segundo pocillo.
- Se procedió a sellar la placa con una película adhesiva transparente MicroAmp™.

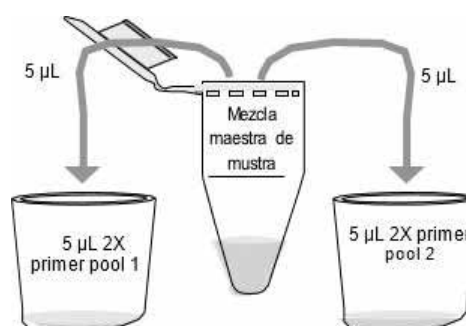


Figura 14. Unión de pool de primers con ADN

B. Amplificación de grupo de primers por PCR

- Para amplificación de regiones objetivas, se ejecutó el siguiente programa.

Tabla 4.

Amplificación de primers por PCR para bibliotecas

Etapa	Paso	Temperatura	Tiempo
Mantenimiento	Activación de la enzima	99 °C	2 minutos
	Desnaturalización	99 °C	15 segundos
Ciclo	Alineamiento y extensión	60 °C	8 minutos
Mantenimiento		10 °C	



Figura 15. Amplificación de primer mediante PCR

C. Proceso de combinación de reacciones de amplificación objetivo

- Se centrifugó brevemente para recoger el contenido en el fondo de los pocillos.
- Se procedió a retirar con cuidado el sello de la placa.
- Para cada muestra, se combinó las reacciones de amplificación objetiva de 10 μL .
- El volumen total para cada muestra debe ser de 20 μL .

D. Proceso de digestión parcial de amplicones

- Se centrifugó brevemente para recoger el contenido en el fondo de los pocillos, luego se procedió al retiro del sello de la placa.
- Se agregaron 2 μL de reactivo FuPa™ a cada muestra amplificada.
- Se procedió al sellado con una película adhesiva transparente, se agitó en vórtex y luego se centrifugó para recoger las gotas.
- Se colocó una almohadilla de compresión en la placa y se cargó en el termociclador.
- Se procedió a la ejecución del siguiente programa en el PCR.

Tabla 5.*Proceso de digestión parcial de amplicones mediante PCR*

Temperatura	Tiempo
50 °C	10 minutos
55 °C	10 minutos
60 °C	20 minutos
10 °C	Mantenimiento

E. Proceso de purificación y ligación de adaptadores a los amplicones

- Se aplicaron los reactivos de acuerdo a la siguiente tabla:

Tabla 6.*Proceso de purificación y ligación de adaptadores*

Orden de adición	Componentes	Volumen
1	Solución Switch™	4 µL
2	Adaptadores de código de barras Ion Torrent™	2 µL
3	ADN Ligasa	2 µL
Total, volumen incluyendo ~ 22 µL de amplicón digerido		~30 µL

- Se procedió a sellar la placa con una nueva película adhesiva transparente MicroAmp™, se agitó en vórtex y se centrifugó brevemente para recoger las gotas.
- Se colocó una almohadilla en la compresión MicroAmp™ y se procedió a la ejecución del siguiente programa.

Tabla 7.*Ligación de adaptadores con amplicones mediante PCR*

Temperatura	Tiempo
22 °C	30 minutos
68 °C	5 minutos
72 °C	5 minutos
10 °C	Mantenimiento

F. Proceso de purificación de librerías

- Se centrifugó brevemente la placa para recoger el contenido en el fondo de los pocillos.
- Se retiró con cuidado el sello de la placa, luego se agregaron 45 µL (1.5 x volumen de muestra) de Reactivo Agencourt™ AMPure™ XP a cada biblioteca.
- Se procedió a pipetear hacia arriba y hacia abajo 5 veces para mezclar bien la suspensión de micro esferas con el ADN.
- Se incubó la mezcla durante 5 minutos a temperatura ambiente.
- Se colocó la placa en una rejilla magnética como el imán lateral DynaMag™, luego se procedió a incubar durante 2 minutos o hasta que la solución se aclare.
- Se retiró con cuidado y se desechó el sobrenadante sin alterar el sedimento.
- Se agregaron 150 µL de etanol al 70% recién preparado, luego se agitó la placa de lado a lado en las dos posiciones del imán para lavar las cuentas y se procedió a retirar con cuidado, luego se desechó el sobrenadante sin alterar el sedimento.
- Se procedió a un segundo lavado.
- Se aseguró de eliminar todas las gotas de etanol de los pozos, manteniendo la placa en el imán y se secó las cuentas al aire a temperatura ambiente durante 5 minutos.

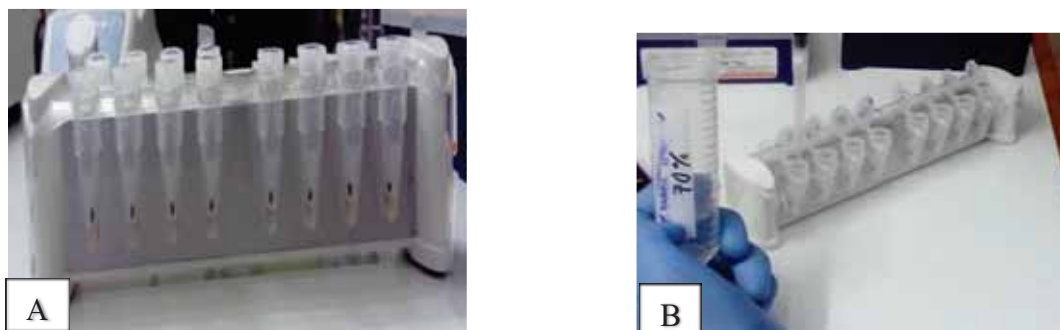


Figura 16. Purificación de librerías de ADN

Nota: A. Unión de amplicones con perlas, B. Lavado de perlas con alcohol para purificación

G. Proceso de amplificación de librería

- Se retiró la placa con bibliotecas purificadas del imán, luego se agregaron 50 μ L de Platinum™ PCR SuperMix HiFi™ y 2 μ L de Library Amplification Primer Mix™ a cada gránulo de perlas y se procedió al sellado de la placa con la película adhesiva MicroAmp™ y se agito en vórtex.
- Se colocó la placa nuevamente en el imán durante al menos 2 minutos para transferir cuidadosamente \sim 50 μ L de sobrenadante de cada pocillo a un pocillo nuevo o una placa nueva sin alterar el sedimento.
- Se procedió a la ejecución del siguiente programa.

Tabla 8.

Proceso de amplificación de librería por PCR.

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

H. Proceso de purificación de biblioteca amplificada

H.1 Primera ronda de purificación

- Se centrifugó brevemente para recoger el contenido en el fondo de los pocillos, luego se retiró el sello de la placa.
- Se agregaron 25 μL de reactivo Agencourt™ AMPure™ XP a cada pocillo de la placa que contenga $\sim 50 \mu\text{L}$ de muestra.
- Se incubó la mezcla durante 5 minutos a temperatura ambiente.
- Se procedió a colocar la placa en un imán como el imán lateral DynaMag™ durante al menos 5 minutos, o hasta que la solución esté transparente.

H.2 Segunda ronda de purificación

- Al sobrenadante del paso anterior, se agregaron 60 μL (1.2 x volumen de muestra original) de Reactivo Agencourt™ AMPure™ XP.
- Se procedió a incubar la mezcla durante 5 minutos a temperatura ambiente.
- Se colocó la placa en el imán durante 3 minutos o hasta que la solución esté transparente y se procedió a retirar con cuidado y luego, se procedió a desechar el sobrenadante sin alterar el sedimento.
- Al final del proceso se observó que los amplicones están unidos a las perlas.
- Se procedió a agregar 150 μL de etanol al 70% recién preparado a cada pocillo, luego se movió la placa de lado a lado en el imán para lavar las cuentas y se procedió a desechar el sobrenadante sin alterar el sedimento.
- Se procedió a repetir los pasos para un segundo lavado.
- En el proceso de segundo lavado, se aseguró de eliminar todas las gotas de etanol de los pozos.

- Manteniendo la placa en el imán, se secó las perlas al aire a temperatura ambiente durante 2 a 5 minutos.
- Se retiró la placa del imán, luego se agregaron 50 μL de LowTE al gránulo para dispersar las perlas.
- Se procedió al sellado de la placa con la película adhesiva MicroAmp™, se agito bien en vótex y luego se centrifugo para recoger las gotas.
- Se procedió a incubar a temperatura ambiente durante al menos 2 minutos.
- Se colocó la placa en el imán durante al menos 2 minutos, luego se procedió analizar una parte (alícuota) del sobrenadante con el flurómetro Qubit™, para la dilución de la librería.



Figura 17. Cuantificación de librerías mediante flurómetro Qubit™

3.6.8.2. Amplificación y enriquecimiento de platilla con Sistema Ion OneTouch™ 2

A. Proceso de amplificación de plantilla

- Se diluyeron las bibliotecas con código de barras, como se describe en la (Tabla 9).

Tabla 9.

Dilución de biblioteca amplificada

Componentes	Volumen
100- pM biblioteca combinada	6 - 8 μL
Agua libre de nucleasas	92 - 94 μL
Volumen total de biblioteca diluida para agregar a la solución de amplificación	100 μL

- Se procedió a agitar en vótex la biblioteca diluida durante 5 segundos, luego se centrifugó durante 2- 5 segundos.
- Se colocó la biblioteca diluida en hielo.
- Al tubo, que contiene 2 mL de mezcla de Ion S5™ Reagent Mix 15 °C a 30 °C, se agregó los siguientes componentes en el orden designado.

Tabla 10.

Adición de reactivos para la amplificación de plantilla

Orden	Reactivo	Volumen
1	Agua libre de nucleasas	80 µL
2	Ion S5™ Enzyme Mix™	120 µL
3	Partículas de esferas iónicas	100 µL
4	Biblioteca diluida	100 µL
	Volumen total (incluida la mezcla de reactivos)	2 400 µL

B. Proceso de llenado del filtro de reacción

- Se colocó el filtro de reacción Ion OneTouch™ en una rejilla para tubos, de modo que los 3 puertos del filtro estén hacia arriba.
- Se identificó el puerto de muestra en el filtro de reacción Ion OneTouch™ y se procedió a agregar la solución de amplificación a través del puerto de muestra.
- Se pipeteó lentamente un volumen de 800 µL de la solución de amplificación de 2.4 mL a través del puerto de muestra.
- Se procedió a agregar 200 µL el aceite de reacción Ion OneTouch™ a través del puerto de muestra.
- Con el émbolo presionado, se retiró la punta del puerto de muestra.



Figura 18. *Proceso de llenado de filtro de reacción Ion OneTouch™.*

C. Proceso de instalación del filtro de reacción en el Ion OneTouch™

- Se levantó el filtro de reacción Ion OneTouch™ directamente del estante de tubos. Con el puerto de muestra todavía a la izquierda, se giró el conjunto del filtro en el sentido de las agujas del reloj, hasta que el tubo de reacción se invierta y los tres puertos apunten hacia abajo.
- Se insertaron los tres puertos en los tres orificios Ion OneTouch™, de modo que el filtro de reacción quedó firmemente asentado en el instrumento.

D. Ejecución de la carrera del Ion OneTouch™

- Después de la instalación del filtro de reacción Ion OneTouch™, se inició la ejecución de la carrera.

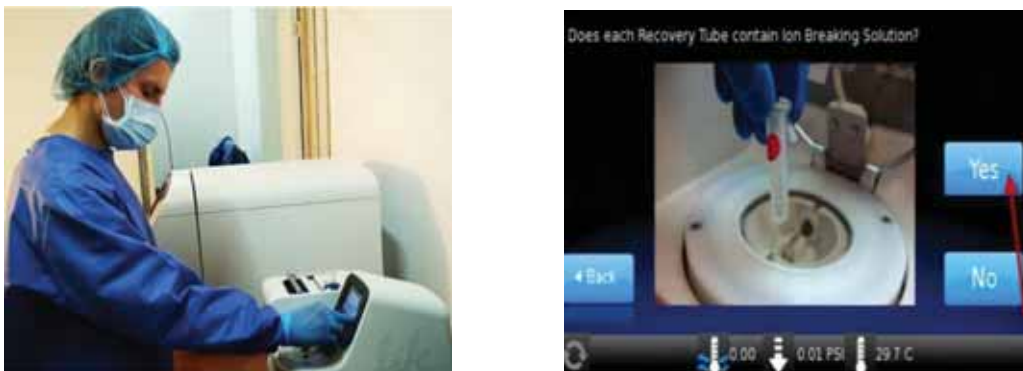


Figura 19. *Ejecución del equipo Ion OneTouch™*

E. Recuperación de las partículas de esferas iónicas con plantilla positiva

- Al final de la ejecución, se procedió a centrifugar la muestra siguiendo las indicaciones de la pantalla del Ion OneTouch™.

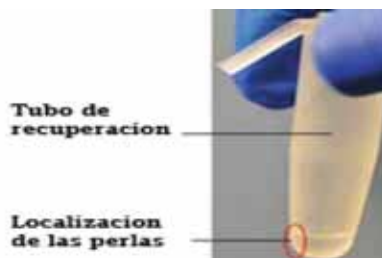


Figura 20. *Tubo de recuperación con esferas iónicas de plantilla positiva*

F. Lavado de partículas de esferas iónicas de plantilla positiva

- Se usó una pipeta para eliminar el sobrenadante hasta 100 μ L de solución de recuperación Ion OneTouch™ de cada tubo de reactivo Ion OneTouch™.
- Se retiró el sobrenadante de la superficie y en el lado opuesto de las perlas, sin perturbar el sedimento de las esferas iónicas positivas de la plantilla.
- Se procedió al re suspensión de las esferas iónicas positivas de plantilla en la solución de recuperación restante en cada tubo, pipeteando la suspensión hacia arriba y hacia abajo.
- Se combinó la suspensión de cada tubo de recuperación en un nuevo tubo Eppendorf Lobina™ de 1.5 mL.
- Se agregaron 100 μ L de agua libre de nucleasas a cada tubo de recuperación, se pipeteo hacia arriba y hacia abajo para mezclar, luego transfirió las perlas restantes al tubo etiquetado de 1.5 mL.
- Se llevaron las suspensiones combinadas en el tubo de 1.5 mL a 1 mL con agua libre de nucleasas.

- Se agitó durante 30 segundos para re suspender completamente las esferas iónicas positivas de la plantilla y luego se centrifugó durante 8 minutos a 15500g.
- Se procedió a eliminar todo el sobrenadante menos 20 μ L
- Se procedió a etiquetar el tubo como referencia.
- En el nuevo tubo etiquetado, se aumentó el volumen de las suspensiones lavadas combinadas a 100 μ L con la solución de re suspensión.
- Se agitó en vótex el sedimento durante 30 segundos para re suspender completamente las esferas iónicas positivas, luego se procedió a centrifugar el tubo durante 2 segundos.



Figura 21. Lavado de partículas de esferas iónicas de plantilla positiva

3.6.8.3. Enriquecimiento de las esferas iónicas positivas

A. Preparación de la solución Melt-Off™

- Se preparó la solución de Melt - Off™ combinando los componentes en el siguiente orden.

Tabla 11.

Adición de reactivos para la solución Melf-Off™

Orden	Componentes	Volumen
1	Solución Tween™	280 µL
2	NaOH	40 µL
	Total	320 µL

B. Proceso de lavado y suspensión de perlas Dynabeads™ MyOne

- Se transfirieron 100 µL de Dynabeads™ MyOne™ y perlas de Estreptavidina C1 a un nuevo tubo Eppendorf ADN LoBind™ de 1.5 mL.
- Se colocó en el DynaMag™ durante 2 minutos y se procedió a retirar y desechar el sobrenadante sin alterar el gránulo de perlas del Dynabeads™ MyOne™ Estreptavidina C1.
- Se agregó 1 mL de solución de lavado Ion OneTouch™ a la parte alícuota de Dynabeads™ perlas de Estreptavidina C1.
- Se retiró el tubo del imán y se procedió a mezclar con el Vortex durante 30 segundos para luego centrifugar el tubo durante 2 segundos.
- Se colocó el tubo en el DynaMag™ durante 2 minutos, luego se procedió a retirar y desechar el sobrenadante.
- Se agregó 130 µL de solución de captura de perlas MyOne™ a las perlas Dynabeads™ MyOne™ y Estreptavidina C1.
- Se retiró el tubo del imán, agitando el tubo en vórtice durante 30 segundos, luego se centrifugó el tubo durante 2 segundos.

C. Proceso de llenado de la tira de 8 pocillos del OneTouch™ ES

- Se aseguró de que la pestaña de forma cuadrada de la tira de 8 pocillos esté a la izquierda.
- Se procedió a pipetear partículas de esferas iónicas hacia arriba y hacia abajo 10 veces para mezclar, luego transfirió todo el volumen (100 µL) de las partículas de esferas iónicas re suspendidas en la solución de re suspensión del pozo 1 de la tira de 8 pozos.
- Se confirma que la pestaña de forma cuadrada esté a la izquierda, luego se insertó la tira llena de 8 pocillos con la tira de 8 pocillos y se presiona hasta el extremo derecho de la ranura de la bandeja de instrumentos Ion OneTouch™ ES.

Tabla 12.

Adición de reactivos en la tira de 8 pocillos

Número de pozos	Reactivo para dispensar en el pozo
Pozo 1	Muestra de partículas de esferas iónicas positiva de plantilla completa (100 µL; preparada en el paso 1)
Pozo 2	130 de Dynabeads™ MyOne™ Estreptavidina C1 perlas re suspendidas en MyOne™ y la solución de captura de perlas.
Pozo 3	300 µL de Ion OneTouch™ ES, Solución de lavado.
Pozo 4	300 µL de Ion OneTouch™ ES, Solución de lavado.
Pozo 5	300 µL de Ion OneTouch™ ES, Solución de lavado.
Pozo 6	Vacío.
Pozo 7	300 µL de solución Melt-Off.
Pozo 8	Vacío.

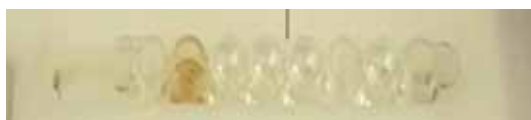


Figura 22. Tira de 8 pocillos del OneTouch™ ES

3.6.8.4. Realizar la carrera en el OneTouch™ ES

- Se procedió a cargar una punta nueva y un tubo de PCR abierto de 0.2 mL en el instrumento Ion OneTouch™ ES, y la tira de 8 pocillos.
- El pozo 1 (muestra partículas de esferas iónicas) es el pozo más a la izquierda y la tira de 8 pozos se empujó a la posición más a la derecha en la ranura (Fig 23).
- Se procedió a pipetear el contenido del pozo 2 hacia arriba y hacia abajo para re-suspender las cuentas antes de comenzar la ejecución teniendo cuidado de introducir burbujas en la solución.
- Se procedió a la ejecución de la carrera.

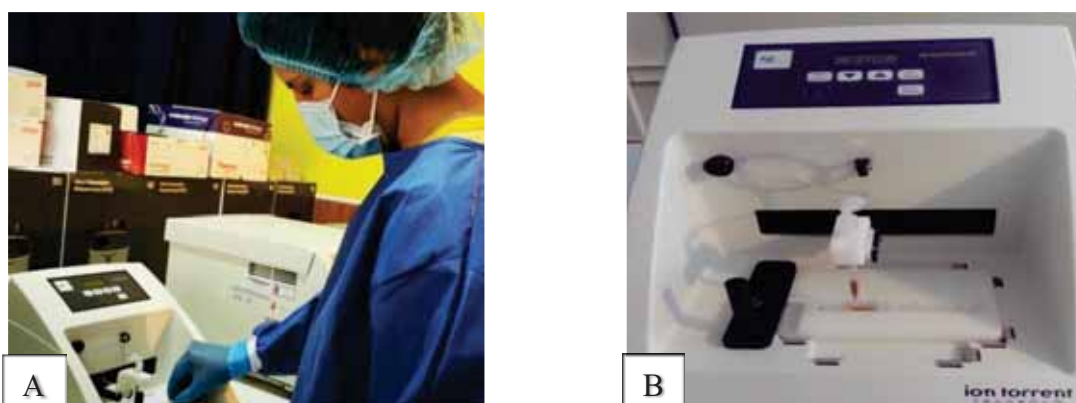


Figura 23. Ejecución de OneTouch™ ES. Nota: A, Cargado de tira de pozos y B, ejecución de OneTouch™ ES

A. Proceso de lavado de las partículas de esferas iónicas enriquecidas

- Se procedió a centrifugar el tubo de PCR de 0.2 mL que contiene las partículas de esferas iónicas enriquecidas a 15500g durante 5 minutos.
- Se retiró el sobrenadante hasta 10 μ L sin alterar el sedimento, luego se agregó 200 μ L de agua libre de nucleasas.

- Se pipeteó la solución hacia arriba y hacia abajo 10 veces para re suspender el sedimento.
- Se procedió a centrifugar el tubo de PCR de 0.2 mL a 15500g por 5 minutos.

B. Cargado de la muestra al chip Ion 520™ para la secuenciación

- Se procedió a dispensar lentamente 40 μ L de la muestra directamente en el puerto de carga del chip, luego se dispensó los 20 μ L restantes en el pozo de carga del chip y se centrifugó durante 5 minutos.
- En un tubo de 1.5 mL, se combina 900 μ L de Annealing Buffer™ al 50% con 100 μ L de Solución Foaming™ (10% Triton™ X-100).
- Se creó espuma agitando vigorosamente.
- Se procedió a colocar el chip en una superficie estable, luego se procedió a inyectar 100 μ L de espuma en el puerto de carga del chip.
- Se retiró el líquido expulsado del pozo de salida.
- Se repitió el paso de inyección de espuma tres veces más para un total de 4 inyecciones.
- Se inyectó 100 μ L de Annealing Buffer al 50% en el puerto de cargado de chips, luego retiró el líquido expulsado del pozo de salida.
- Se repitió el paso de lavado tres veces más para un total de cuatro.



Figura 24. Cargado de muestra en el chip 520™ para la secuenciación

C. Proceso de cargado de Chip en el secuenciador ion torrent S5

- Se procedió a inicializar el secuenciador.
- Se aseguró el chip cargado con Partículas Ion Sphere™ positivas para plantilla en la abrazadera del Secuenciador y se procedió a seleccionar el plan de ejecución en el software Torrent Suite™.

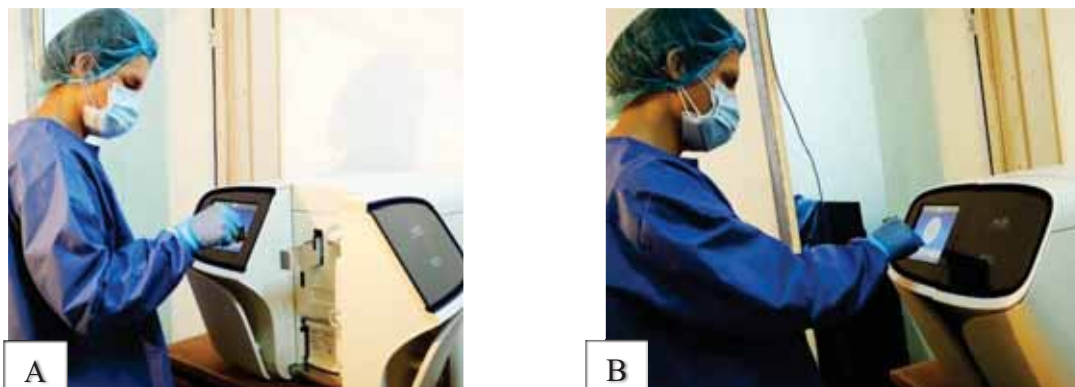


Figura 25. Ejecución del secuenciador Ion Torrent. Nota. A. Cargado del Chip en el secuenciador, B. ejecución del programa Ion Torrent

3.6.9. Análisis de datos

Tras la secuenciación de las muestras se realizó un análisis primario mediante el software Torrent Suite™, en un proceso denominado base calling se obtuvieron diferentes ficheros tipo fastq, que contienen los “datos crudos” de la secuenciación para cada muestra, las secuencias de las bases nucleotídicas y un valor de calidad técnico asociado a cada una de ellas, además se obtuvieron información sobre otros datos técnicos, tales como uniformidad o espectro del tamaño de los fragmentos, así como una primera aproximación de las variantes alélicas detectadas en cada muestra (fichero alleles_IonExpress.xls).

Los datos de las ejecuciones no alineados de secuenciación en Ion Torrent PGM™ se transfirieron automáticamente al servidor Torrent, que aloja el software Torrent Suite™ v4.4.3 (Thermo Fisher Scientific, Inc).

El software Torrent Suite utilizó el navegador Torrent, que incluye el programa de Mapeo Torrent para la alineación y Torrent Variant Caller el llamado de variantes, el programa de alineación de Mapeo Torrent, realizó automáticamente la alineación de la secuencia de acuerdo con la secuencia de referencia de la alpaca Carlotta -Vicugna_pacos-2.0.1 (GCA_000164845.2) obtenidas del NCBI (Centro Nacional de Información Biotecnológica).

El software Torrent Variant Caller realizó, el control de calidad y el análisis de datos, el llamado de polimorfismos de un solo nucleótido (SNP), polimorfismos multinucleotídicos (PNM), inserciones (INS) y deleciones (DEL) dentro secuencia del genoma de la alpaca como referencia en el Software Torrent Suite™.

Se configuró el programa Variant Caller, para ajustar la configuración de los parámetros, para afectar la rigurosidad de las llamadas de variantes. Los ajustes a los parámetros equilibraron la especificidad (es decir, las llamadas de falso positivo) y la sensibilidad (es decir, las llamadas de verdadero positivo). Con los filtros de calidad, los cuales se utilizaron:

- Frecuencia alélica menor: 5%
- Valor p de equilibrio de Hardy Weinberg: 0.001%
- Máximo de variantes faltantes por muestra: 90%

Los datos generados a través de la secuenciación se transfirieron y analizaron simultáneamente en el servidor Ion Torrent; el análisis inicial incluyó el procesamiento de señales y llamadas de bases, produciendo secuencias de ADN asociadas con lecturas individuales. Las secuencias fueron ensambladas y analizadas con el programa Ion Reporter del equipo, se anotaron y exportaron todas las variantes; se exportó mediante en el formato Variant Caller, que incluía llamadas de alelos y varias estadísticas de secuenciación (como la profundidad y calidad de secuenciación, la frecuencia de alelos y el tipo de marcadores y ubicación cromosómica) para cada muestra, los resultados se descargaron en línea en formato de (archivo alleles_IonExpress.xls).

3.7. Aplicación estadística

Los análisis de asociación de genes con fenotipos de color de fibra, se realizaron con la prueba básica de asociación de casos y controles χ^2 , utilizando el software PLINK v1.90b4 (Purcell et al., 2007).

Para corregir los errores de falso positivo que se dan por el tamaño de variantes, se aplicó la corrección de Bonferroni o la tasa de falsos descubrimientos (Laurie et al., 2010)

CAPÍTULO IV

RESULTADOS

4.1. Identificación de variantes del gen *IRF4* asociadas al color de fibra en alpacas mediante el tipo de variante polimórfica

Se identificó 224 nuevas variaciones del gen *IRF4*, en la región promotora, 5'UTR y 3'UTR, codificadora (exones) así como regiones intrónicas parciales en 210 alpacas de colores blanco, negro y marrón, de las cuales se encontraron 180 SNP, 14 polimorfismos de múltiples nucleótidos, 21 deleciones y 9 inserciones (Tabla 13).

Tabla 13.

Número de variantes encontradas en alpacas de color blanco, café y negro

Variantes	Alpacas Blancas	Alpacas Negras	Alpacas marrones	TOTAL
N.º de SNP	70	37	68	174
N.º de MNP	7	1	8	16
N.º de DEL	10	3	8	22
N.º de INS	4	0	4	8
TOTAL	91	41	88	220

En el 100% de alpacas secuenciadas, hubo 19% de variantes heterocigotas, 7% de variantes homocigota, 36% de variantes ausentes y 38% de las muestras no pudieron ser leídas (Fig. 26).

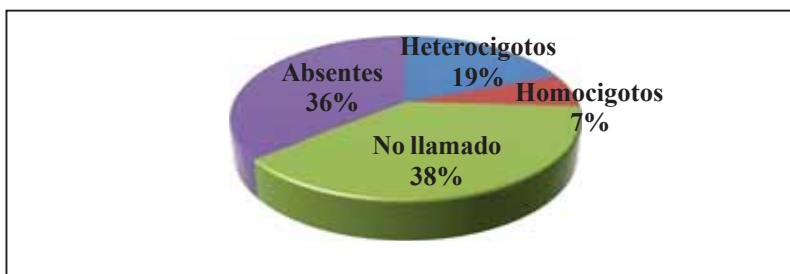


Figura 26. *Porcentaje de variantes encontradas en 210 alpacas*

En 83 alpacas de color blanco se encontró un total de 91 variantes (Tabla 13), de los cuales se encontró un promedio de 21% de variantes heterocigotas, 5% de variantes homocigotas, 32% de variantes ausentes y 41% de variantes no llamadas (ver anexo 5), del total de variantes se encontraron 70 polimorfismos de nucleótido simple, 7 polimorfismos de múltiples nucleótidos, 10 deleciones y 4 inserciones (Tabla 13).

En 74 alpacas de color negro se encontró un total de 41 variantes (ver anexo 3) de los cuales se encontró un promedio de 29% de variantes heterocigotas, 71% de variantes homocigotas, no se encontraron variantes ausentes y variantes no llamadas (ver anexo 6), del total de variantes encontradas se encontraron 37 polimorfismos de nucleótido simple, un polimorfismo de múltiples nucleótidos, tres deleciones, no se encontraron inserciones en las alpacas analizadas (Tabla 13).

En 53 alpacas de color marrón se encontró un total 88 variantes (ver anexo 4) de los cuales se encontró un promedio de 8% de variantes heterocigotas, 3% de variantes homocigotas, 45% de variantes ausentes y 44% de variantes no llamadas (ver anexo 7), del total de variantes encontradas se encontraron 68 polimorfismos de nucleótido simple, 8 polimorfismos de múltiples nucleótidos, 8 deleciones y 4 inserciones (Tabla 13).

Se amplificó un fragmento de, 4715 pares de bases que corresponde al 99.64% de la región codificante, así como regiones intrónicas parciales del gen *IRF4*, utilizando para ello 16 pares de cebadores (Tabla 2). El gen fue secuenciado en un total de 210 alpacas para el cromosoma 20, donde se ubica el gen *IRF4*. El alineamiento de dichas secuencias por el programa Multalin permitió obtener una secuencia consenso que fue comparada mediante el programa BlastN (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>) con las secuencias de genes ortólogos en otras especies (Tabla 14).

Tabla 14.

Similitud nucleotídica del IRF4 en alpacas. y secuencias ortologas

Especie	N.º de acceso	Similitud nucleotídica (%)
<i>Camelus bactrianus</i>	XM_010968565.2	95.35
<i>Bos taurus</i>	XM_024983463.1	91.83
<i>Homo sapiens</i>	NG_027728.1	86.56
<i>Sus scrofa</i>	XM_021097964.1	91.88

Estos resultados indican que el gen *IRF4* tiene una alta variación a entre especies, incluso una cercana como es el *Camelus bactrianus*. Al realizar el alineamiento de la secuencia aminoacídica con otras especies se encontró una similitud más cercana con el *Camelus bactrianus*, comparando con el *Camelus dromedarius*, los detalles se observan en la Figura 27.

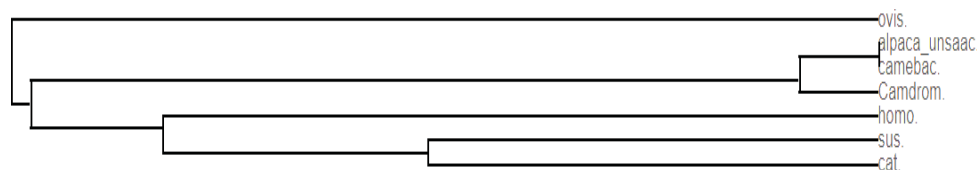


Figura 27. Comparación con secuencias aminoacídicas entre la alpaca y otras especies

4.2. Identificación de variantes del gen IRF4 asociadas al color de fibra en alpacas mediante número de variantes encontrados en exones

En el presente estudio se ha podido secuenciar el 99.64% del gen *IRF4* en alpacas, se encontraron variaciones en la región codificadora, de un total de 9 exones en 8 se encontraron variaciones, encontrándose que en el exón 3 y exón 5, no se encontraron variaciones. En la región codificadora se encontraron 47 variantes en los 9 exones del gen *IRF4*, entre ellos 35 polimorfismos de nucleótido simple, dos polimorfismos de nucleótido múltiple, cuatro deleciones y seis inserciones (Tabla 15).

Tabla 15.

Número de variantes encontradas en exones en 210 alpacas

ALPACAS					
EXONES	SNP	MNP	DEL	INS	TOTAL DE VARIANTES
Exón 1	4	0	0	0	4
Exón 2	4	2	0	1	7
Exón 3	0	0	0	0	0
Exón 4	2	0	1	0	3
Exón 5	0	0	0	0	0
Exón 6	3	0	2	0	5
Exón 7	6	0	0	4	10
Exón 8	6	0	1	1	8
Exón 9	2	0	0	0	2
Exón 10	8	0	0	0	8
TOTAL	35	2	4	6	47

En 83 alpacas blancas en la región codificadora se encontró un total de 19 variantes, de los cuales, 14 fueron polimorfismos de nucleótido simple, un polimorfismo de nucleótido múltiple, una delección y tres fueron inserciones (ver anexo 8).

En 74 alpacas de color negro en la región codificadora solo se encontraron un total de 3 polimorfismos de nucleótido simple, en los exones 6, 8 y 10 respectivamente (ver anexo 9).

En 53 alpacas de color marrón, se encontró un total de 25 variantes en la región codificadora, encontrándose, 18 polimorfismos de nucleótido simple, un polimorfismo de nucleótido múltiple, tres delecciones y tres inserciones (ver anexo 10).

4.3. Identificación de variantes del gen IRF4 asociadas al color de fibra en alpacas mediante número de variantes encontrados en intrones

En la región no codificadora se encontraron 173 variantes en los 9 intrones del gen *IRF4*, entre ellos 140 polimorfismos de nucleótido sencillo, 13 polimorfismos de nucleótido múltiple, 18 delecciones y dos inserciones (Tabla 16).

Tabla 16.*Número de variantes encontradas en Intrones en 210 alpacas*

INTRONES	ALPACAS				TOTAL DE VARIANTES
	SNP	MNP	DEL	INS	
Intrón 1	2	0	0	0	2
Intrón 2	7	0	0	0	7
Intrón 3	5	1	1	0	7
Intrón 4	28	1	0	0	29
Intrón 5	3	0	0	0	3
Intrón 6	18	3	3	0	24
Intrón 7	28	1	2	1	32
Intrón 8	27	2	7	0	36
Intrón 9	22	5	5	1	33
TOTAL	140	13	18	2	173

En 83 alpacas blancas en la región no codificadora de alpacas de color blanco se encontró un total de 38 variantes, de los cuales, se encontraron 34 polimorfismos de nucleótido simple, un polimorfismo de nucleótido múltiple, 3 deleciones y no se observaron inserciones (ver anexo 8).

En 74 alpacas de color negro en la región no codificadora de alpacas de color negro se encontró un total de 38 variantes, de los cuales, se encontraron 34 polimorfismos de nucleótido simple, un polimorfismo de nucleótido múltiple, tres deleciones y ninguna inserción. (Ver anexo 9).

En 53 alpacas de color marrón, en la región no codificadora de alpacas de color negro, se encontró un total de 63 variantes, de los cuales, se encontraron 50 polimorfismos de nucleótido simple, seis polimorfismos de nucleótido múltiple, seis deleciones y una inserción (ver anexo 10).

4.4. Estudios de asociación entre el gen *IRF4* y polimorfismos con relación al color en alpacas

Tabla 17.

Análisis de asociación de alpacas de color blanco y alpacas de color

Cromosoma	Posición del SNP	Alelo menor	Frecuencia de alelo en casos	Frecuencia de alelo en controles	Alelo mayor	Chi-cuadrado	P-Valué
NW_005882714	17381093	T	0.7857	0,1429	C	23.26	0.00002506
NW_005882714	17381207	A	0.7692	0,1429	T	21.42	0.000003685

En el análisis de asociación de alpacas de color de fibra blanco y alpacas de color, se identificaron dos SNPs sinónimos, en las ubicaciones c.17381093 y c.17381207 (Tabla 17).

En la ubicación c.17381207, se encontró el cambio de A>T en el intro 6, mediante la realización equilibrio de Hardy-Weinberg observamos una frecuencia alelica de 79% del alelo menor a comparación del 14% en el alelo mayor; se realizó la prueba de hipótesis de chi-cudrado al 5% para evaluar la asociación del polimorfismo del gen *IRF4* con el fenotipo de, obteniendo un valor $P \leq 0.000003685$ (Tabla 17).

En la ubicación c.17381093, se encontró el cambio de T>C en el intro 6, mediante la realización equilibrio de Hardy-Weinberg observamos una frecuencia alelica de 77% del alelo menor a comparación del 14% en el alelo mayor; se realizó una prueba de hipótesis de chiq-cudrado al 5% para evaluar la asociación del polimorfismo del gen *IRF4*, obteniendo un valor $P \leq 0.00002506$ (Tabla 17).

DISCUSIÓN

Estos resultados guardan relación con lo que sostiene Praetorius (2013), Adhikari (2016), Gathany (2009), Sturm (2009), Do et al., (2010), Zhang et al., (2013) y Han, (2008), quienes señalan que el gen *IRF4* está asociado con el color del cabello y la pigmentación de la piel en humanos. Estos autores expresan que el polimorfismo SNP rs12203592 del gen *del factor regulador del interferón 4*, muestra asociación significativa con el fenotipo de pigmentación del cabello. Sulem (2007), Liu (2010), Eriksson (2010). Jacobs (2013), Jacobs et al. (2015), Nan (2009), Liu et al., (2015) y Han (2008), ubican el *SNP* rs12203592 del gen *IRF4* relacionado con la asociación con fenotipos de pigmentación humana y el color de cabello, ello no es completamente acorde con lo que en este estudio se halla, puesto que en este trabajo se encontró que esta variante asociada al color de fibra de alpaca está en el intrón 6.

De igual manera, en el estudio de Visser (2015), señala que el intrón 7 del gen *IRF4* está asociado al fenotipo de pigmentación del cabello en humanos. Ello también no es acorde con lo que se halla en el estudio, puesto que en este trabajo afirma que la variante asociada con el color de fibra de alpaca está en el intrón 6; estos resultados diferentes se explican por la ausencia de homología en las regiones intrónicas de humanos y camélidos sudamericanos.

Varios estudios demostraron que los SNP no codificantes, asociados con un determinado fenotipo, pueden tener elementos potenciadores que regulan la transcripción de un gen diana, las actividades de esos potenciadores se modulan según el estado alélico del gen asociados a rasgos Visser, (2015) y Harismendy (2011).

El presente estudio es inédito, puesto que no se encontraron reportes de las variantes del gen *IRF4* asociada al color de fibra en camélidos.

CONCLUSIÓN

A partir de los hallazgos encontrados, se acepta la hipótesis alternativa, que establece la existencia de variaciones del gen *IRF4* asociadas con el fenotipo de color en fibra de alpaca.

- Con el presente estudio se identificaron 220 nuevas variaciones del gen *IRF4*, en la región promotora, 5'UTR y 3'UTR y codificadora (exones e intrones), de las cuales se encontraron 174 polimorfismos de nucleótido simple, 16 polimorfismos de múltiples nucleótidos, 22 deleciones y 8 inserciones.
- En la región codificadora, se encontraron 47 variantes del gen *IRF4*, no se indentificó variaciones en el exón 3 y 5.
- En la región no codificadora, se encontraron 173 variantes del gen *IRF4*.
- En la asociación de alpacas de blancas y de color, se identificaron 2AE SNPs sinónimas en el intrón 6, en las ubicaciones c.17381093, con cambio en A>T con un valor $P \leq 0.000003685$ y c.17381207 con cambio en T>C con un valor $P \leq 0.00002506$.

RECOMENDACIONES

- Se recomienda a la UNSAAC o veterinarios interesados realizar estudios in vitro que demuestren que el intrón 6 influye en la función de un elemento potenciador que regula la expresión de *IRF4*.
- Se recomienda a los investigadores realizar estudios de asociación del gen *IRF4* y la enzima tirosinasa (*TYR*), para descubrir si el gen participa en la inducción con esta enzima, que es una pieza clave en la síntesis de melanina.
- Se recomienda a los investigadores en genética realizar estudios de asociación con fenotipos específicos de color de fibra, con ayuda de espectrofotómetro.

BIBLIOGRAFIA

- Adhikari, K; Fontanil, T., Cal, S., Mendoza-Revilla, J., Fuentes-Guajardo, M., Chacón-Duque, J. C., Al-Saadi, F., Johansson, J. A., Quinto-Sanchez, M., Acuña-Alonzo, V., Jaramillo, C., Arias, W., Barquera Lozano, R., Macín Pérez, G., Gómez-Valdés, J., Villamil-Ramírez, H., Hunemeier, T., Ramallo, V., Silva de Cerqueira, C. C., Hurtado, M., ... Ruiz-Linares, A. (2016). A genome-wide association scan in admixed Latin Americans identifies loci influencing facial and scalp hair features. *Nature communications*, 7, 10815.
<https://doi.org/10.1038/ncomms10815>
- Ancans, J., Tobin, D. J., Hoogduijn, M. J., Smit, N. P., Wakamatsu, K., & Thody, A. J. (2001). Melanosomal pH controls rate of melanogenesis, eumelanin/phaeomelanin ratio and melanosome maturation in melanocytes and melanoma cells. *Experimental cell research*, 268(1), 26–35. <https://doi.org/10.1006/excr.2001.5251>.
- Aranguren-Méndez, J., Jordana, J., & Gomez, M. (2001). Genetic diversity in Spanish donkey breeds using microsatellite DNA markers. *Genetics, selection, evolution: GSE*, 33(4), 433–442. <https://doi.org/10.1186/1297-9686-33-4-433>
- 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>
- Alvarado S. G. (2020). Molecular Plasticity in Animal Pigmentation: Emerging Processes Underlying Color Changes. *Integrative and comparative biology*, 60(6), 1531–1543.
<https://doi.org/10.1093/icb/icaa142>

- Bennett, D. C., & Lamoreux, M. L. (2003). The color loci of mice--a genetic century. *Pigment cell research*, *16*(4), 333–344. <https://doi.org/10.1034/j.1600-0749.2003.00067.x>
- Bettters, E., Liu, Y., Kjaeldgaard, A., Sundström, E., & García-Castro, M. I. (2010). Analysis of early human neural crest development. *Developmental biology*, *344*(2), 578–592. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2010.05.012>
- Betticher, D. C., Thatcher, N., Altermatt, H. J., Hoban, P., Ryder, W. D., & Heighway, J. (1995). Alternate splicing produces a novel cyclin D1 transcript. *Oncogene*, *11*(5), 1005–1011.
- Botstein, D., & Risch, N. (2003). Discovering genotypes underlying human phenotypes: past successes for mendelian disease, future approaches for complex disease. *Nature genetics*, *33 Suppl*, 228–237. <https://doi.org/10.1038/ng1090>
- Brass, A. L., Kehrl, E., Eisenbeis, C. F., Storb, U., & Singh, H. (1996). Pip, a lymphoid-restricted *IRF*, contains a regulatory domain that is important for autoinhibition and ternary complex formation with the Ets factor PU.1. *Genes & development*, *10*(18), 2335–2347. <https://doi.org/10.1101/gad.10.18.2335>
- Brass, A. L., Zhu, A. Q., & Singh, H. (1999). Assembly requirements of PU.1-Pip (*IRF-4*) activator complexes: inhibiting function in vivo using fused dimers. *The EMBO journal*, *18*(4), 977–991. <https://doi.org/10.1093/emboj/18.4.977>
- Buermans, H. P., & Den Dunnen, J. T. (2014). Next generation sequencing technology: Advances and applications. *Biochimica et biophysica acta*, *1842*(10), 1932–1941. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2014.06.015>
- Bustinza, V. y Apaza, E. (1990). Problemática de las alpacas de color. *Informe técnico PAL-IIPC-Puno*, (38).

- Caballero de la Calle, J.R. y Carrión, E. (1995). *Coloraciones o capas del ganado* (1.^a ed.). Madrid: Ediciones Mundi Prensa
- Caratachea, M. (2007). Polimorfismos genéticos: Importancia y aplicaciones. *Rev inst nal enf resp mex*, 213-221.
- Cargill, M., Altshuler, D., Ireland, J., Sklar, P., Ardlie, K., Patil, N., Shaw, N., Lane, C. R., Lim, E. P., Kalyanaraman, N., Nemesh, J., Ziaugra, L., Friedland, L., Rolfe, A., Warrington, J., Lipshutz, R., Daley, G. Q., & Lander, E. S. (1999). Characterization of single-nucleotide polymorphisms in coding regions of human genes. *Nature genetics*, 22(3), 231–238.
<https://doi.org/10.1038/10290>
- Cieslak, M., Reissmann, M., Hofreiter, M., and Ludwig, A. (2011). Colours of domestication. *Biol. Rev.* 86, 885–899. doi:10.1111/j.1469-185X.2011.00177.x.
- Chhabra, Y., Yong, H., Fane, M. E., Soogrim, A., Lim, W., Mahiuddin, D. N., Kim, R., Ashcroft, M., Beatson, S. A., Ainger, S. A., Smit, D. J., Jagirdar, K., Walker, G. J., Sturm, R. A., & Smith, A. G. (2018). Genetic variation in *IRF4* expression modulates growth characteristics, tyrosinase expression and interferon-gamma response in melanocytic cells. *Pigment cell & melanoma research*, 31(1), 51–63.
<https://doi.org/10.1111/pcmr.12620>
- Commo, S., & Bernard, B. A. (2000). Melanocyte subpopulation turnover during the human hair cycle: an immunohistochemical study. *Pigment cell research*, 13(4), 253–259.
<https://doi.org/10.1034/j.1600-0749.2000.130407.x>
- Crowther-Swanepoel, D., Broderick, P., Di Bernardo, M. C., Dobbins, S. E., Torres, M., Mansouri, M., Ruiz-Ponte, C., Enjuanes, A., Rosenquist, R., Carracedo, A., Jurlander, J., Campo, E., Juliusson, G., Montserrat, E., Smedby, K. E., Dyer, M. J., Matutes, E., Dearden, C., Sunter,

- N. J., Hall, A. G., ... Houlston, R. S. (2010). Common variants at 2q37.3, 8q24.21, 15q21.3 and 16q24.1 influence chronic lymphocytic leukemia risk. *Nature genetics*, 42(2), 132–136. <https://doi.org/10.1038/ng.510>
- Dell'Angelica, E. C. (2003). Melanosome biogenesis: shedding light on the origin of an obscure organelle. *Trends in cell biology*, 13(10), 503–506. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2003.08.001>
- Do, T. N., Ucisik-Akkaya, E., Davis, C. F., Morrison, B. A., & Dorak, M. T. (2010). An intronic polymorphism of *IRF4* gene influences gene transcription in vitro and shows a risk association with childhood acute lymphoblastic leukemia in males. *Biochimica et biophysica acta*, 1802(2), 292–300. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2009.10.015>
- Dressman, D., Yan, H., Traverso, G., Kinzler, K. W., & Vogelstein, B. (2003). Transforming single DNA molecules into fluorescent magnetic particles for detection and enumeration of genetic variations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(15), 8817–8822. <https://doi.org/10.1073/pnas.1133470100>
- Duan, J., Wainwright, M. S., Comeron, J. M., Saitou, N., Sanders, A. R., Gelernter, J., & Gejman, P. V. (2003). Synonymous mutations in the human dopamine receptor D2 (DRD2) affect mRNA stability and synthesis of the receptor. *Human molecular genetics*, 12(3), 205–216. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddg055>.
- Duffy, D. L., Iles, M. M., Glass, D., Zhu, G., Barrett, J. H., Höiom, V., Zhao, Z. Z., Sturm, R. A., Soranzo, N., Hammond, C., Kvaskoff, M., Whiteman, D. C., Mangino, M., Hansson, J., Newton-Bishop, J. A., GenoMEL, Bataille, V., Hayward, N. K., Martin, N. G., Bishop, D. T., ... Montgomery, G. W. (2010). *IRF4* variants have age-specific effects on nevus count

- and predispose to melanoma. *American journal of human genetics*, 87(1), 6–16.
<https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2010.05.017>
- Edwards, S. L., Beesley, J., French, J. D., & Dunning, A. M. (2013). Beyond GWASs: illuminating the dark road from association to function. *American journal of human genetics*, 93(5), 779–797. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2013.10.012>
- Eriksson, N., Macpherson, J. M., Tung, J. Y., Hon, L. S., Naughton, B., Saxonov, S., Avey, L., Wojcicki, A., Pe'er, I., & Mountain, J. (2010). Web-based, participant-driven studies yield novel genetic associations for common traits. *PLoS genetics*, 6(6), e1000993.
<https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1000993>
- Ernfors, P. (2010). Cellular origin and developmental mechanisms during the formation of skin melanocytes. *Experimental cell research*, 316(8), 1397–1407.
<https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2010.02.042>
- Escalante, C. R., Yie, J., Thanos, D., & Aggarwal, A. K. (1998). Structure of *IRF-1* with bound DNA reveals determinants of interferon regulation. *Nature*, 391(6662), 103–106.
<https://doi.org/10.1038/34224>
- Ewing, B., & Green, P. (1998). Base-calling of automated sequencer traces using phred. II. Error probabilities. *Genome research*, 8(3), 186–194.
- Ewing, B., Hillier, L., Wendl, M. C., & Green, P. (1998). Base-calling of automated sequencer traces using phred. I. Accuracy assessment. *Genome research*, 8(3), 175–185.
<https://doi.org/10.1101/gr.8.3.175>
- FAO. (2005). Situación actual de los camélidos sudamericanos en Perú. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación, Roma, Italia. 62 pp 32

- Fitzpatrick, T. B., & Breathnach, A. S. (1963). Das Epidermale Melanin-Einheit-System. *Dermatologische Wochenschrift*, *147*, 481–489.
- Fuller, B. B., Spaulding, D. T., & Smith, D. R. (2001). Regulation of the catalytic activity of preexisting tyrosinase in black and Caucasian human melanocyte cell cultures. *Experimental cell research*, *262*(2), 197–208.
<https://doi.org/10.1006/excr.2000.5092>
- Gallegos, R. (2005). *Mejoramiento Genético Animal*. [Tesis de post grado]. Universidad Nacional del Altiplano.
- Gathany, A. H., Hartge, P., Davis, S., Cerhan, J. R., Severson, R. K., Cozen, W., Rothman, N., Chanock, S. J., & Wang, S. S. (2009). Relationship between interferon regulatory factor 4 genetic polymorphisms, measures of sun sensitivity and risk for non-Hodgkin lymphoma. *Cancer causes & control : CCC*, *20*(8), 1291–1302.
<https://doi.org/10.1007/s10552-009-9348-5>
- Gnirke, A., Melnikov, A., Maguire, J., Rogov, P., LeProust, E. M., Brockman, W., Fennell, T., Giannoukos, G., Fisher, S., Russ, C., Gabriel, S., Jaffe, D. B., Lander, E. S., & Nusbaum, C. (2009). Solution hybrid selection with ultra-long oligonucleotides for massively parallel targeted sequencing. *Nature biotechnology*, *27*(2), 182–189.
<https://doi.org/10.1038/nbt.1523>
- Goodwin, S., McPherson, J. D., & McCombie, W. R. (2016). Coming of age: ten years of next-generation sequencing technologies. *Nature reviews. Genetics*, *17*(6), 333–351.
<https://doi.org/10.1038/nrg.2016.49>

- Gregor, M. (2006). Production, attributes and relative value of alpaca fleeces in southern australia and implications for industry development. *Rev. Small Rumin* 61, 93–111. <https://doi: 10.1016/j.smallrumres.2005.07.001>.
- Gnerre, S., Heiman, D., Young, S., Fulton, L., Delehaunty, K., Minx, P., Chinwalla, A., Mardis, E., Wilson, R. y Warren, W. "La secuencia del genoma de Vicugna pacos (alpaca)". <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/ABRR00000000.2> .
- Griffiths A., Gelbart W., Miller J., Lewontin R. (2000). *Genética Moderna*. McGraw Hill. Interamericana S.A.
- Gronenborn, B., & Messing, J. (1978). Methylation of single-stranded DNA in vitro introduces new restriction endonuclease cleavage sites. *Nature*, 272(5651), 375–377. <https://doi.org/10.1038/272375a0>
- Grossman, A., Mittrücker, H. W., Nicholl, J., Suzuki, A., Chung, S., Antonio, L., Suggs, S., Sutherland, G. R., Siderovski, D. P., & Mak, T. W. (1996). Cloning of human lymphocyte-specific interferon regulatory factor (hLSIRF/hIRF4) and mapping of the gene to 6p23-p25. *Genomics*, 37(2), 229–233. <https://doi.org/10.1006/geno.1996.0547>
- Gualco, G., Weiss, L. M., & Bacchi, C. E. (2010). MUM1/IRF4: A Review. *Applied immunohistochemistry & molecular morphology : AIMM*, 18(4), 301–310. <https://doi.org/10.1097/PAI.0b013e3181cfl126>
- Guo, J., Tao, H., Li, P., Li, L., Zhong, T., Wang, L., Ma, J., Chen, X., Song, T., & Zhang, H. (2018). Whole-genome sequencing reveals selection signatures associated with important traits in six goat breeds. *Scientific reports*, 8(1), 10405. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-28719-w>

- Gupta, S., Jiang, M., Anthony, A., & Pernis, A. B. (1999). Lineage-specific modulation of interleukin 4 signaling by interferon regulatory factor 4. *The Journal of experimental medicine*, *190*(12), 1837–1848. <https://doi.org/10.1084/jem.190.12.1837>
- Haass, N. K., & Herlyn, M. (2005). Normal human melanocyte homeostasis as a paradigm for understanding melanoma. *The journal of investigative dermatology. Symposium proceedings*, *10*(2), 153–163. <https://doi.org/10.1111/j.1087-0024.2005.200407.x>
- Han, J., Kraft, P., Nan, H., Guo, Q., Chen, C., Qureshi, A., Hankinson, S. E., Hu, F. B., Duffy, D. L., Zhao, Z. Z., Martin, N. G., Montgomery, G. W., Hayward, N. K., Thomas, G., Hoover, R. N., Chanock, S., & Hunter, D. J. (2008). A genome-wide association study identifies novel alleles associated with hair color and skin pigmentation. *PLoS genetics*, *4*(5), e1000074. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1000074>
- Harada, H., Taniguchi, T., & Tanaka, N. (1998). The role of interferon regulatory factors in the interferon system and cell growth control. *Biochimie*, *80*(8-9), 641–650. [https://doi.org/10.1016/s0300-9084\(99\)80017-0](https://doi.org/10.1016/s0300-9084(99)80017-0)
- Harismendy, O., Notani, D., Song, X., Rahim, N. G., Tanasa, B., Heintzman, N., Ren, B., Fu, X. D., Topol, E. J., Rosenfeld, M. G., & Frazer, K. A. (2011). 9p21 DNA variants associated with coronary artery disease impair interferon- γ signalling response. *Nature*, *470*(7333), 264–268. <https://doi.org/10.1038/nature09753>
- Hattori M. (2005). *Tanpakushitsu kakusan koso. Protein, nucleic acid, enzyme*, *50*(2), 162–168.
- Hearing V. J. (2000). The melanosome: the perfect model for cellular responses to the environment. *Pigment cell research*, *13 Suppl 8*, 23–34. <https://doi.org/10.1034/j.1600-0749.13.s8.7.x>

- Hirokawa, N., & Noda, Y. (2008). Intracellular transport and kinesin superfamily proteins, KIFs: structure, function, and dynamics. *Physiological reviews*, 88(3), 1089–1118. <https://doi.org/10.1152/physrev.00023.2007>
- Hodgkinson, C. A., Moore, K. J., Nakayama, A., Steingrímsson, E., Copeland, N. G., Jenkins, N. A., & Arnheiter, H. (1993). Mutations at the mouse microphthalmia locus are associated with defects in a gene encoding a novel basic-helix-loop-helix-zipper protein. *Cell*, 74(2), 395–404.
- Hoek, K. S., Schlegel, N. C., Eichhoff, O. M., Widmer, D. S., Praetorius, C., Einarsson, S. O., Valgeirsdottir, S., Bergsteinsdottir, K., Schepsky, A., Dummer, R., & Steingrímsson, E. (2008). Novel MITF targets identified using a two-step DNA microarray strategy. *Pigment cell & melanoma research*, 21(6), 665–676. <https://doi.org/10.1111/j.1755-148X.2008.00505.x>
- INEI. 2012. IV Censo Nacional Agropecuario del Peru 2012.
- Iozumi, K., Hoganson, G. E., Pennella, R., Everett, M. A., & Fuller, B. B. (1993). Role of tyrosinase as the determinant of pigmentation in cultured human melanocytes. *The Journal of investigative dermatology*, 100(6), 806–811. <https://doi.org/10.1111/1523-1747.ep12476630>
- Ito, S., & Wakamatsu, K. (2008). Chemistry of mixed melanogenesis--pivotal roles of dopaquinone. *Photochemistry and photobiology*, 84(3), 582–592. <https://doi.org/10.1111/j.1751-1097.2007.00238.x>
- Ito, S., & Wakamatsu, K. (2011). Diversity of human hair pigmentation as studied by chemical analysis of eumelanin and pheomelanin. *Journal of the European Academy of Dermatology*

- and Venereology* : *JEADV*, 25(12), 1369–1380. <https://doi.org/10.1111/j.1468-3083.2011.04278.x>
- Jackson, I. J. (1997). Homologous pigmentation mutations in human, mouse and other model organisms. *Human molecular genetics*, 6(10), 1613–1624. <https://doi.org/10.1093/hmg/6.10.1613>
- Jacobs, L. C., Hamer, M. A., Gunn, D. A., Deelen, J., Lall, J. S., van Heemst, D., Uh, H. W., Hofman, A., Uitterlinden, A. G., Griffiths, C., Beekman, M., Slagboom, P. E., Kayser, M., Liu, F., & Nijsten, T. (2015). A Genome-Wide Association Study Identifies the Skin Color Genes *IRF4*, *MC1R*, *ASIP*, and *BNC2* Influencing Facial Pigmented Spots. *The Journal of investigative dermatology*, 135(7), 1735–1742. <https://doi.org/10.1038/jid.2015.62>
- Jacobs, L. C., Wollstein, A., Lao, O., Hofman, A., Klaver, C. C., Uitterlinden, A. G., Nijsten, T., Kayser, M., & Liu, F. (2013). Comprehensive candidate gene study highlights *UGT1A* and *BNC2* as new genes determining continuous skin color variation in Europeans. *Human genetics*, 132(2), 147–158. <https://doi.org/10.1007/s00439-012-1232-9>
- Jimbow, K., Quevedo, W. C., Jr, Fitzpatrick, T. B., & Szabo, G. (1976). Some aspects of melanin biology: 1950-1975. *The Journal of investigative dermatology*, 67(1), 72–89. <https://doi.org/10.1111/1523-1747.ep12512500>
- Klein, U., Casola, S., Cattoretti, G., Shen, Q., Lia, M., Mo, T., Ludwig, T., Rajewsky, K., & Dalla-Favera, R. (2006). Transcription factor *IRF4* controls plasma cell differentiation and class-switch recombination. *Nature immunology*, 7(7), 773–782. <https://doi.org/10.1038/ni1357>
- Kobayashi, N., Nakagawa, A., Muramatsu, T., Yamashina, Y., Shirai, T., Hashimoto, M. W., Ishigaki, Y., Ohnishi, T., & Mori, T. (1998). Supranuclear melanin caps reduce ultraviolet

- induced DNA photoproducts in human epidermis. *The Journal of investigative dermatology*, 110(5), 806–810. <https://doi.org/10.1046/j.1523-1747.1998.00178.x>
- Kohn, A. B., Moroz, T. P., BARNes, J. P., Netherton, M., & Moroz, L. L. (2013). Single-cell semiconductor sequencing. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 1048, 247–284. https://doi.org/10.1007/978-1-62703-556-9_18
- Kondo, T., & Hearing, V. J. (2011). Update on the regulation of mammalian melanocyte function and skin pigmentation. *Expert review of dermatology*, 6(1), 97–108. <https://doi.org/10.1586/edm.10.70>
- Laino, A. M., Berry, E. G., Jagirdar, K., Lee, K. J., Duffy, D. L., Soyer, H. P., & Sturm, R. A. (2018). Iris pigmented lesions as a marker of cutaneous melanoma risk: an Australian case-control study. *The British journal of dermatology*, 178(5), 1119–1127. <https://doi.org/10.1111/bjd.16323>
- Land, E. J., Ito, S., Wakamatsu, K., & Riley, P. A. (2003). Rate constants for the first two chemical steps of eumelanogenesis. *Pigment cell research*, 16(5), 487–493. <https://doi.org/10.1034/j.1600-0749.2003.00082.x>
- Laurie, C. C., Doheny, K. F., Mirel, D. B., Pugh, E. W., Bierut, L. J., Bhangale, T., Boehm, F., Caporaso, N. E., Cornelis, M. C., Edenberg, H. J., Gabriel, S. B., Harris, E. L., Hu, F. B., Jacobs, K. B., Kraft, P., Landi, M. T., Lumley, T., Manolio, T. A., McHugh, C., Painter, I., ... GENEVA Investigators (2010). Quality control and quality assurance in genotypic data for genome-wide association studies. *Genetic epidemiology*, 34(6), 591–602. <https://doi.org/10.1002/gepi.20516>
- Lauvergne, J., Frank, E., Renieri, C. Y Antonini, M. (1998). *Descripción y clasificación de los fenotipos de color en camélidos domésticos sudamericanos*. (1ª pp 159-163). DESCO.

- Le Douarin, N. M., Creuzet, S., Couly, G., & Dupin, E. (2004). Neural crest cell plasticity and its limits. *Development (Cambridge, England)*, *131*(19), 4637–4650. <https://doi.org/10.1242/dev.01350>
- Lin, M. T., Storer, B., Martin, P. J., Tseng, L. H., Gooley, T., Chen, P. J., & Hansen, J. A. (2003). Relation of an interleukin-10 promoter polymorphism to graft-versus-host disease and survival after hematopoietic-cell transplantation. *The New England journal of medicine*, *349*(23), 2201–2210. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa022060>
- Liu, F., Visser, M., Duffy, D. L., Hysi, P. G., Jacobs, L. C., Lao, O., Zhong, K., Walsh, S., Chaitanya, L., Wollstein, A., Zhu, G., Montgomery, G. W., Henders, A. K., Mangino, M., Glass, D., Bataille, V., Sturm, R. A., Rivadeneira, F., Hofman, A., van IJcken, W. F., ... Kayser, M. (2015). Genetics of skin color variation in Europeans: genome-wide association studies with functional follow-up. *Human genetics*, *134*(8), 823–835. <https://doi.org/10.1007/s00439-015-1559-0>
- Liu, F., Wen, B., & Kayser, M. (2013). Colorful DNA polymorphisms in humans. *Seminars in cell & developmental biology*, *24*(6-7), 562–575. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2013.03.013>
- Mamanova, L., Coffey, A. J., Scott, C. E., Kozarewa, I., Turner, E. H., Kumar, A., Howard, E., Shendure, J., & Turner, D. J. (2010). Target-enrichment strategies for next-generation sequencing. *Nature methods*, *7*(2), 111–118. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1419>
- Matsuyama, T., Grossman, A., Mittrücker, H. W., Siderovski, D. P., Kiefer, F., Kawakami, T., Richardson, C. D., Taniguchi, T., Yoshinaga, S. K., & Mak, T. W. (1995). Molecular cloning of *LSIRF*, a lymphoid-specific member of the interferon regulatory factor family

- that binds the interferon-stimulated response element (ISRE). *Nucleic acids research*, 23(12), 2127–2136. <https://doi.org/10.1093/nar/23.12.2127>
- Maxam, A. M., & Gilbert, W. (1977). A new method for sequencing DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 74(2), 560–564. <https://doi.org/10.1073/pnas.74.2.560>
- Metzker, M. (2010). Sequencing technologies - the next generation. *Nature reviews. Genetics*, 11(1), 31–46. <https://doi.org/10.1038/nrg2626>
- Meyerhans, A., Vartanian, J. P., & Wain-Hobson, S. (1990). DNA recombination during PCR. *Nucleic acids research*, 18(7), 1687–1691. <https://doi.org/10.1093/nar/18.7.1687>
- Moore G (1965) Haciendo más componentes en circuitos integrados. *Electrónica* 38
- Moritz, C. (1999). Conservations units and translocations: strategies for evolutionary processes. *Hereditas*, 130: 217_228.
- Montes, G., Sundzin, M., Correa, J., & Glade, A. (1983). Estudio Hematologico de Proteinas Totales y Fibrinogeno en Alpacas (Lama Pacos)de la Provincia de Paranicota Chile. *Archivos de Medicina Veterinaria*.
- Nakano, M., Komatsu, J., Matsuura, S., Takashima, K., Katsura, S., & Mizuno, A. (2003). Single-molecule PCR using water-in-oil emulsion. *Journal of biotechnology*, 102(2), 117–124. [https://doi.org/10.1016/s0168-1656\(03\)00023-3](https://doi.org/10.1016/s0168-1656(03)00023-3)
- Nan, H., Kraft, P., Qureshi, A. A., Guo, Q., Chen, C., Hankinson, S. E., Hu, F. B., Thomas, G., Hoover, R. N., Chanock, S., Hunter, D. J., & Han, J. (2009). Genome-wide association study of tanning phenotype in a population of European ancestry. *The Journal of investigative dermatology*, 129(9), 2250–2257. <https://doi.org/10.1038/jid.2009.62>

- Natkunam, Y., Warnke, R. A., Montgomery, K., Falini, B., & van De Rijn, M. (2001). Analysis of MUM1/*IRF4* protein expression using tissue microarrays and immunohistochemistry. *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc*, *14*(7), 686–694. <https://doi.org/10.1038/modpathol.3880373>
- NCBI Resource Coordinators (2018). Database resources of the National Center for Biotechnology Information. *Nucleic acids research*, *46*(D1), D8–D13. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx1095>
- Nicholas, F. (1990). *Genética Veterinaria*. Acribia S.A.
- Niedringhaus, T. P., Milanova, D., Kerby, M. B., Snyder, M. P., & Barron, A. E. (2011). Landscape of next-generation sequencing technologies. *Analytical chemistry*, *83*(12), 4327–4341. <https://doi.org/10.1021/ac2010857>
- Nishimura, E. K. (2011). Melanocyte stem cells: a melanocyte reservoir in hair follicles for hair and skin pigmentation. *Pigment cell & melanoma research*, *24*(3), 401–410. <https://doi.org/10.1111/j.1755-148X.2011.00855.x>
- Oetting, W. S., & King, R. A. (1994). Analysis of tyrosinase mutations associated with tyrosinase-related oculocutaneous albinism (OCA1). *Pigment cell research*, *7*(5), 285–290. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0749.1994.tb00629.x>
- Okou, D. T., Steinberg, K. M., Middle, C., Cutler, D. J., Albert, T. J., & Zwick, M. E. (2007). Microarray-based genomic selection for high-throughput resequencing. *Nature methods*, *4*(11), 907–909. <https://doi.org/10.1038/nmeth1109>

- Ozato, K., Taylor, P., & Kubota, T. (2007). The interferon regulatory factor family in host defense: mechanism of action. *The Journal of biological chemistry*, 282(28), 20065–20069.
<https://doi.org/10.1074/jbc.R700003200>
- Paun, A., & Pitha, P. M. (2007). The *IRF* family, revisited. *Biochimie*, 89(6-7), 744–753.
<https://doi.org/10.1016/j.biochi.2007.01.014>
- Pośpiech, E., Kukla-Bartoszek, M., Karłowska-Pik, J., Zieliński, P., Woźniak, A., Boroń, M., Dąbrowski, M., Zubańska, M., Jarosz, A., Grzybowski, T., Płoski, R., Spólnicka, M., & Branicki, W. (2020). Exploring the possibility of predicting human head hair greying from DNA using whole-exome and targeted NGS data. *BMC genomics*, 21(1), 538.
<https://doi.org/10.1186/s12864-020-06926-y>
- Pośpiech, E., Wojas-Pelc, A., Walsh, S., Liu, F., Maeda, H., Ishikawa, T., Skowron, M., Kayser, M., & Branicki, W. (2014). The common occurrence of epistasis in the determination of human pigmentation and its impact on DNA-based pigmentation phenotype prediction. *Forensic science international. Genetics*, 11, 64–72.
<https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2014.01.012>
- Potapov, V., & Ong, J. L. (2017). Correction: Examining Sources of Error in *PCR* by Single-Molecule Sequencing. *PloS one*, 12(7), e0181128.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0181128>
- Praetorius, C., Grill, C., Stacey, S. N., Metcalf, A. M., Gorkin, D. U., Robinson, K. C., Van Otterloo, E., Kim, R. S., Bergsteinsdottir, K., Ogmundsdottir, M. H., Magnusdottir, E., Mishra, P. J., Davis, S. R., Guo, T., Zaidi, M. R., Helgason, A. S., Sigurdsson, M. I., Meltzer, P. S., Merlino, G., Petit, V., ... Steingrimsson, E. (2013). A polymorphism in *IRF4*

- affects human pigmentation through a tyrosinase-dependent MITF/TFAP2A pathway. *Cell*, 155(5), 1022–1033. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.10.022>
- Protas, M. E., & Patel, N. H. (2008). Evolution of coloration patterns. *Annual review of cell and developmental biology*, 24, 425–446. <https://doi.org/10.1146/annurev.cellbio.24.110707.175302>
- Purcell, S., Neale, B., Todd-Brown, K., Thomas, L., Ferreira, M. A., Bender, D., Maller, J., Sklar, P., de Bakker, P. I., Daly, M. J., & Sham, P. C. (2007). PLINK: a tool set for whole-genome association and population-based linkage analyses. *American journal of human genetics*, 81(3), 559–575. <https://doi.org/10.1086/519795>
- Raggi, A. & R, German. (1998). *Avances en fisiología y adaptación de Camélidos Sudamericanos*. Avances en ciencias veterinarias.
- Rehm, H. L., Bale, S. J., Bayrak-Toydemir, P., Berg, J. S., Brown, K. K., Deignan, J. L., Friez, M. J., Funke, B. H., Hegde, M. R., Lyon, E., & Working Group of the American College of Medical Genetics and Genomics Laboratory Quality Assurance Committee (2013). ACMG clinical laboratory standards for next-generation sequencing. *Genetics in medicine : official journal of the American College of Medical Genetics*, 15(9), 733–747. <https://doi.org/10.1038/gim.2013.92>
- Rusk N. (2011). One genome, two haplotypes. *Nature methods*, 8(2), 107. <https://doi.org/10.1038/nmeth0211-107>
- Safran, R. J. & McGraw, K. J. (2004). *Plumage coloration, not length or symmetry of tail-streamers, is a sexually selected trait in North American bARN swallows*. Behavioral Ecology.

- Sanger, F., & Coulson, A. R. (1975). A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase. *Journal of molecular biology*, 94(3), 441–448. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(75\)90213-2](https://doi.org/10.1016/0022-2836(75)90213-2).
- Sanger, F., Coulson, A. R., Barrell, B. G., Smith, A. J., & Roe, B. A. (1980). Cloning in single-stranded bacteriophage as an aid to rapid DNA sequencing. *Journal of molecular biology*, 143(2), 161–178. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(80\)90196-5](https://doi.org/10.1016/0022-2836(80)90196-5)
- Sanger, F., Donelson, J. E., Coulson, A. R., Kössel, H., & Fischer, D. (1973). Use of DNA polymerase I primed by a synthetic oligonucleotide to determine a nucleotide sequence in phage fl DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 70(4), 1209–1213. <https://doi.org/10.1073/pnas.70.4.1209>
- Sanger, F., Nicklen, S., & Coulson, A. R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 74(12), 5463–5467. <https://doi.org/10.1073/pnas.74.12.5463>
- Schallreuter, K., Slominski, A., Pawelek, J. M., Jimbow, K., & Gilchrist, B. A. (1998). What controls melanogenesis?. *Experimental dermatology*, 7(4), 143–150. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0625.1998.tb00315.x>
- Schiaffino M. V. (2010). Signaling pathways in melanosome biogenesis and pathology. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 42(7), 1094–1104. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2010.03.023>
- Shaffer, A. L., Emre, N. C., Lamy, L., Ngo, V. N., Wright, G., Xiao, W., Powell, J., Dave, S., Yu, X., Zhao, H., Zeng, Y., Chen, B., Epstein, J., & Staudt, L. M. (2008). *IRF4* addiction in multiple myeloma. *Nature*, 454(7201), 226–231. <https://doi.org/10.1038/nature07064>

- Shaffer, A. L., Emre, N. C., Romesser, P. B., & Staudt, L. M. (2009). *IRF4: Immunity. Malignancy! Therapy?*. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, *15*(9), 2954–2961. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-08-1845>
- Silvers, W. (1979). The Coat Colours of Mice, *Springer Verlag*. pp. 125–146.
- Slagsvold, T. (1995). Predation favours cryptic coloration in breeding male pied flycatchers. *Animal Behaviour*, (50), 1109-1121.
- Slominski, A., Plonka, P. M., Pisarchik, A., Smart, J. L., Tolle, V., Wortsman, J., & Low, M. J. (2005). Preservation of eumelanin hair pigmentation in proopiomelanocortin-deficient mice on a nonagouti (a/a) genetic background. *Endocrinology*, *146*(3), 1245–1253. <https://doi.org/10.1210/en.2004-0733>
- Smith, D. R., Spaulding, D. T., Glenn, H. M., & Fuller, B. B. (2004). The relationship between Na(+)/H(+) exchanger expression and tyrosinase activity in human melanocytes. *Experimental cell research*, *298*(2), 521–534. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2004.04.033>
- Solís, R. (2000). *Producción de camélidos sudamericanos. Estudio zootécnico de la llama y del guanaco*. (2^a ed. pp. 230). Imprenta Ríos.
- Steingrímsson, E., Copeland, N. G., & Jenkinson, N. A. (2006). Mouse coat color mutations: from fancy mice to functional genomics. *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists*, *235*(9), 2401–2411. <https://doi.org/10.1002/dvdy.20840>
- Steingrímsson, E., Moore, K. J., Lamoreux, M. L., Ferré-D'Amaré, A. R., Burley, S. K., Zimring, D. C., Skow, L. C., Hodgkinson, C. A., Arnheiter, H., & Copeland, N. G. (1994).

- Molecular basis of mouse microphthalmia (mi) mutations helps explain their developmental and phenotypic consequences. *Nature genetics*, 8(3), 256–263. <https://doi.org/10.1038/ng1194-256>
- Stockholm, E. (2007). *Sweden Methods and Applications in DNA Sequence Alignments*. Karolinska institutet.
- Strub, T., Giuliano, S., Ye, T., Bonet, C., Keime, C., Kobi, D., Le Gras, S., Cormont, M., Ballotti, R., Bertolotto, C., & Davidson, I. (2011). Essential role of microphthalmia transcription factor for DNA replication, mitosis and genomic stability in melanoma. *Oncogene*, 30(20), 2319–2332. <https://doi.org/10.1038/onc.2010.612>
- Sturm R. A. (2009). Molecular genetics of human pigmentation diversity. *Human molecular genetics*, 18(R1), R9–R17. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddp003>
- Sulem, P., Gudbjartsson, D. F., Stacey, S. N., Helgason, A., Rafnar, T., Magnusson, K. P., Manolescu, A., Karason, A., Palsson, A., Thorleifsson, G., Jakobsdottir, M., Steinberg, S., Pálsson, S., Jonasson, F., Sigurgeirsson, B., Thorisdottir, K., Ragnarsson, R., Benediktsdottir, K. R., Aben, K. K., Kiemeny, L. A., ... Stefansson, K. (2007). Genetic determinants of hair, eye and skin pigmentation in Europeans. *Nature genetics*, 39(12), 1443–1452. <https://doi.org/10.1038/ng.2007.13>
- Sundram, U., Harvell, J. D., Rouse, R. V., & Natkunam, Y. (2003). Expression of the B-cell proliferation marker MUM1 by melanocytic lesions and comparison with S100, gp100 (HMB45), and MelanA. *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc*, 16(8), 802–810. <https://doi.org/10.1097/01.MP.0000081726.49886.CF>

- Sunyaev, S., Ramensky, V., & Bork, P. (2000). Towards a structural basis of human non-synonymous single nucleotide polymorphisms. *Trends in genetics : TIG*, *16*(5), 198–200. [https://doi.org/10.1016/s0168-9525\(00\)01988-0](https://doi.org/10.1016/s0168-9525(00)01988-0)
- Sutton G, Liu E, y Jongeneel CV. Kedes L (2011) Judging the Archon Genomics X PRIZE for whole human genome sequencing. *Nature genetics*, *43*(3), 175. <https://doi.org/10.1038/ng0311-175>
- Tellez, C., McCarty, M., Ruiz, M., & Bar-Eli, M. (2003). Loss of activator protein-2alpha results in overexpression of protease-activated receptor-1 and correlates with the malignant phenotype of human melanoma. *The Journal of biological chemistry*, *278*(47), 46632–46642. <https://doi.org/10.1074/jbc.M309159200>
- Tobin D. J. (2011). The cell biology of human hair follicle pigmentation. *Pigment cell & melanoma research*, *24*(1), 75–88. <https://doi.org/10.1111/j.1755-148X.2010.00803.x>
- Valverde, P., Healy, E., Jackson, I., Rees, J. L., & Thody, A. J. (1995). Variants of the melanocyte-stimulating hormone receptor gene are associated with red hair and fair skin in humans. *Nature genetics*, *11*(3), 328–330. <https://doi.org/10.1038/ng1195-328>
- Vancoillie, G., Lambert, J., Mulder, A., Koerten, H. K., Mommaas, A. M., Van Oostveldt, P., & Naeyaert, J. M. (2000). Kinesin and kinectin can associate with the melanosomal surface and form a link with microtubules in normal human melanocytes. *The Journal of investigative dermatology*, *114*(3), 421–429. <https://doi.org/10.1046/j.1523-1747.2000.00896.x>
- Vidal, O. (1996). *Selección y Clasificación de Fibra de Alpaca*. Informe técnico N° 4.
- Vierstraete, A. (20 de 05 de 2012). *Welcome to the Homepage of Andy Vierstraete*. Obtenido de <https://users.ugent.be/~avierstr/>

- Visser, M., Palstra, R. J., & Kayser, M. (2014). Human skin color is influenced by an intergenic DNA polymorphism regulating transcription of the nearby BNC2 pigmentation gene. *Human molecular genetics*, 23(21), 5750–5762. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddu289>
- Visser, M., Palstra, R. J., & Kayser, M. (2015). Allele-specific transcriptional regulation of *IRF4* in melanocytes is mediated by chromatin looping of the intronic rs12203592 enhancer to the *IRF4* promoter. *Human molecular genetics*, 24(9), 2649–2661. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddv029>
- Wasmeier, C., Hume, A. N., Bolasco, G., & Seabra, M. C. (2008). Melanosomes at a glance. *Journal of cell science*, 121(Pt 24), 3995–3999. <https://doi.org/10.1242/jcs.040667>
- Watabe, H., Valencia, J. C., Le Pape, E., Yamaguchi, Y., Nakamura, M., Rouzaud, F., Hoashi, T., Kawa, Y., Mizoguchi, M., & Hearing, V. J. (2008). Involvement of dynein and spectrin with early melanosome transport and melanosomal protein trafficking. *The Journal of investigative dermatology*, 128(1), 162–174. <https://doi.org/10.1038/sj.jid.5701019>
- Watabe, H., Valencia, J. C., Yasumoto, K., Kushimoto, T., Ando, H., Muller, J., Vieira, W. D., Mizoguchi, M., Appella, E., & Hearing, V. J. (2004). Regulation of tyrosinase processing and trafficking by organellar pH and by proteasome activity. *The Journal of biological chemistry*, 279(9), 7971–7981. <https://doi.org/10.1074/jbc.M309714200>
- Williams, R., Peisajovich, S. G., Miller, O. J., Magdassi, S., Tawfik, D. S., & Griffiths, A. D. (2006). Amplification of complex gene libraries by emulsion PCR. *Nature methods*, 3(7), 545–550. <https://doi.org/10.1038/nmeth896>

- Wu, R., & Kaiser, A. D. (1968). Structure and base sequence in the cohesive ends of bacteriophage lambda DNA. *Journal of molecular biology*, 35(3), 523–537. [https://doi.org/10.1016/s0022-2836\(68\)80012-9](https://doi.org/10.1016/s0022-2836(68)80012-9)
- Xuan, J., Yu, Y., Qing, T., Guo, L., & Shi, L. (2013). Next-generation sequencing in the clinic: promises and challenges. *Cancer letters*, 340(2), 284–295. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2012.11.025>
- Yamaguchi, K., Watanabe, C., Kawaguchi, A., Sato, T., Naka, I., Shindo, M., Moromizato, K., Aoki, K., Ishida, H., & Kimura, R. (2012). Association of melanocortin 1 receptor gene (MC1R) polymorphisms with skin reflectance and freckles in Japanese. *Journal of human genetics*, 57(11), 700–708. <https://doi.org/10.1038/jhg.2012.96>
- Yohe, S., & Thyagarajan, B. (2017). Review of Clinical Next-Generation Sequencing. *Archives of pathology & laboratory medicine*, 141(11), 1544–1557. <https://doi.org/10.5858/arpa.2016-0501-RA>
- Zhang, M., Song, F., Liang, L., Nan, H., Zhang, J., Liu, H., Wang, L. E., Wei, Q., Lee, J. E., Amos, C. I., Kraft, P., Qureshi, A. A., & Han, J. (2013). Genome-wide association studies identify several new loci associated with pigmentation traits and skin cancer risk in European Americans. *Human molecular genetics*, 22(14), 948–2959. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddt142>
- Zhu, P., He, L., Li, Y., Huang, W., Xi, F., Lin, L., Zhi, Q., Zhang, W., Tang, YT, Geng, C., Lu, Z., y Xu, X. (2014). OTG-SNPcaller: una canalización optimizada basada en TMAP y GATK para llamadas SNP a partir de datos de torrent de iones. *PloS one*, 9 (5), e97507. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0097507>

ANEXOS

Anexo 1. *Tabla con el Gen IRF4 en alpacas marcadas con Primers*

<p>CTGGGGCTCAAGGGCATTCTTGGGGCAAAGAGTGGAGCAGTTGTTGGGTGCGGCGCACCTGAGATG CGAGATCCTTGGCACGCGGGGCCACCAAGGGAGCGGGAAGCTCAGGAGTGGGCAAGAGTGGAAACT GACAGCAAGAGGGGACCTGACTGGCCACGGCTTGAGAATGGGCGGAGGGGGCGGAAACTACGAGTG AGTGCAGAAACGGAGTGCCACGCGTCGTGGCGGCTGGACCGGCGAGGGCGCGCGAAGGCTAGAGC TGCCTGTCTGGGCAGCGCTTGTGCTGCGGGCGCGTCACAGGAATGGAGAGTCCAGAAAGCTGGGTA GGAGGGTGGACTGGGAGGCGGCGGGACTGCGGCGCCAGGGCAGGAGCCCAGGGCCCCTGAGAAG GTGCCCTTCTTGGGGGCCGTCGGCAACGCCGACTCGGTAGCGCTCGCCCCGCCACCTCAGAGCCTCC GGGGCCTCGTGGTCAATTGCCGGAGGGCGGCCCTCTCTCCCTGCAGCCCAGAGCGAGCGCGGGAG GCGGATCCCGGGCGTGCGGGAGGACGGTGTCTGCGCACGGGGCATGAACCTGGAGGGCAGCGGCC GCGGCGGGGACTTCGGCATGAGCGCCGTGAGCTGCGGCAACGGGAAGCTGCGCCAGTGGCTGATCG ACCAGATCGACAGCGCAAGTACCCGGGGCTGGTGTGGGAGAACGAGGAGAAGAGCATCTCCGC ATCCCCTGGAAGCACNN NN NN NN NN NN NN NN NN NN NN NN NN NN NN NN NN NN NN NN NNNNNNNNNNNNNTGTTTCTCCCTCTGTCATCTCGGTCCGACTCGGTCTCTCCAAGTTTCTCTCCGGAA GTTTTGCGAGGCTCTCGCGCTACCCTCTTCTCTCTCCCTCTCAGGGCCTCTGTTTGGGCCTCTCT CTACCGGTTTGCCTCGCCCCCGTGTGTGTCCTGTGTCATGACCGCTTCCCCCTTGGGCAGTTTACCC AGTGACCTGTGCTTTCAGACTCAGCCCTACCACCTGTGGGCAGAGCAGAGGGGACTTCCCTCAGGGA ACTTGCTCAGAGCATCTCAGATCGAATGATGGCCAGAGGTGCTCTGTGGGCGGCCCTCGCCCCAC AGCTCTGCCCTACTTCCAACCTATCCCCTTCAGACGCTGGGTGGGCGGGGCCCTTCCAGGGGTC CTGCAGCCTCACGCACCTTTCACAAAACTGGCATCTTCTGTTCCACAGTTCTGGCAACCTGTG AATCTGAAGCCCTAACACTGTTCTTTCCCTTAGAAAATACAGTTCACAGATTCTTTTCTGAAAGATCTA CATTTTACCCTCCCCCTCTTCCTTCCACCCAGGCTTGGGCACTATTCAAAGGAAAGTTTCGAGAAG GCATCGACAAGCCAGACCCTCCTACCTGGAAGACACGTTTGCATGTGCTCTGAACAAGAGCAACG ACTTCGAGGAGCTGGTGGAGCGGAGCCAGCTGGACATCTCGGACCCCTACAAAGTGTACAGGATCG TCCCCGAGGGCGCCAAGAAAGGTAGGGCTTCTGACTGGGGCTGCCGCCACTTAAACGCCTTAAT TTCAATCTCGGGGCTCTTTTCTGGTCTTGGTTTTTTGTAGCCTGTCTGCCAGCCTCAGCCTCCCAT TCAAGCCCAGCAAGCTATTTGGGTACACATGGAAATTCTCCAGCGCAGGCTAATTTCTCAGACTCC AAGTCTACCTGTGTGTGCGTGCATGTATGTTTTCCAGTTCTGCTAAGATGTGGGCCAAATTCCAA ACCAAAAATGAAAAGGCTGTTTCAACCGTTACTTCTCTATCAGTTCTCTCATGATTAAGTGGTTTGT GAAGGGAGGCGCACACAGTCCAGATGTTGTTGCCATTACATCTTAATAAAAAGTGTCAACTTCAAAGT GTGCCATGGTCAACTTGGGTGCTTATTAATATTAGATTCCCACTTTTCAAAGATTCTGACCAGTGTGT CAAAACAGAGCCCAGGAGTCTGCCATTTAAACCACAAGGTGACCTCACCAGCAGCGTATTTGCTGG GCCGTCACGTCACAAGGCTCATGGCCCATGGCTTACCCACTTCCCTCCTTGGCCTACACGCGTTG GACCTCGCGGGAACCAGTTTAATGGCCTGGACAATAATGCCCAAGGGAATTGCAAAAAAATGCCT TATTTGTCAACAATGTTATGCATTCTAGGAATTAACCCCTCAGGTATTTTTCTAAGATTGACGTTTA GTCATGTCAGTTCCCTTTTTACTCTGTGCACTTCCCTTCTGCCTAACACTCAGGAGCAAAGCAGCT</p>
--

GGCCCTGGAGGACCCACAGCTGCCATGAGCCACCCCTACAGCGTGACAGCACCTTACACCCCACT
CCCGGCTCAGGTATGGGAGGGCAGGGCTTCAGGAAGGGGAGGCTGGGTCTGTGTGAGGCACACAC
AGCGGAAGAGACCCAAGACAAAACAGCAGAACTTCATTTTTGCTCTTAGTCAAACAGCCAAGGCAA
ACCCTGGGCCACTGGGTGACTGCCTGGCTTCCACCTGGTGTGCCGTGGGAGCAGGTTTCAGGCCG
AGGAGGGCGGGAGTGTCTGCCTGTTGGCCAGATGCTACTACGGATGCTGAAATCTGGGAAACAGGC
CTTTTGTGGAAGTCAAAGCTTCTGGAACCAGGGCTTATCATGTGAAACCACAGGGCAGATGATCCC
TGCAGACTCAACTGCTGTGAATTACAGCTCTGTTTGTATCCGCTCTGCTGGGTGGGAGAAGACGCATT
TCCCGGCAGTGCCTGCTGGTGCAGGTTAACCATGTGATGAGCTTTACAACACTGTCTCCACTGTGCT
TTTTCGTTCTTCGTGGCGAGTTTCCACCAAGCCTTCTCGGATGATAAGACAATTTGGCCGCCGGCCAC
ACAAGAGGTTCCCAGGAGTTTGCAGGACTCCTCGAGGGCCGCCCTGAGCTGGTGGCTCCCTCA
AGCTCCACTCTGGTCCCTCCAGCAGGTTACAACACTACATGATCCCGCCCCACGACCGAGGCTGGAG
GGAGTTTCGTCCCTGATCAGCCGCACCCAGAGATCCCGTACCAGTGTCTGTGGCCTTTGGACCCCGC
AGCCACCACTGGCAAGGCCATCCTGTGAAAATGGTAAGGAGGGCACTGCGACAGCTCCTGTGGCC
AGAAGGCTGCCCCCTCTGGCCTGTCTCTGGGCAGTCCCTCCTCAGAGCTGTTGGGAAAGGCACCC
CCTGCAGTGAAGGAGAGGAGGGGACCCAGAGGAGGGATACTGAAGGTCAGTGCAGCCTGGCCTG
TGTGTGCCAGGACTTAGGCTCAGCGCTGCCTCCTGGAATCTTCTTTAAACATTGCAGGGGTCCCTCC
AGGCCCTGTTTCTATAGGTGCAAGCTCACACCATGTAAGCAACGTGCCCAAAGTTACCCAGTGAG
AGTGGAGGGCTGGGATCAGTGTGAGGCCTCCTAACCCCAAAGTCCAGCCACGTAACACAGAAGAT
GTCAGATTTCAAACCTGGTTGGCAGTATTTCTTAAATTATCTGCTTAGTAAGGTAGCATGTTTCTTCT
CCCTGAATAATCTTAAACTTCGTTTTCAACCTTGGGGAAAAAGTAGTAGATTTTGGCAGTCTCCCCA
GAGAAGACGGAATTGTCCTTAATGCTGGCTGTTCTGTCCACGTGTCTGTGAAACCAGCACATGGC
AGCTGTGCCCGTGCCTCCCTCCACAGGGACACTGGGAGGTCGCTGCCCCAGCGTGTCTCTCTACA
CGGCAGTCGTGCCACCGAGTTGTTGCTGGGCTAGGGCGACAATAAGAAGGGAGTGAATGAGCACT
GTCAGGAGGACGTA AAAAGGCCCCCGAGCCCTGGCTGGGGCCGTTTTGGTCTGGATTGGAAGTGC
TTGCCAGAGCCTTCCCCAGACACCGAGATGAGATCTTGCCGCAGAAGCACTGACTTGCTAAGTGC
AGAGAAGATTTACATGGTATGATTACAGTACATCAAAGCACAAGCTTTTAGGACTTCCGAGTTAGTT
ATCCGAGTGGAAATTCTAAGACTGGTCAACATACAGATCCTTTTGTATGTTCTAGGAGTATTGCTG
CTTTCTCTGGTACGTCACGTCACGTCCTTGGCTTGTGGTATTGGCTACATATACGTTATTTAGATT
AGTATTGCATGACATGTTTATTA AAAAGCTCAGATTTTGGTTTTAATAGCTTTTCCAGAGTGATTGCG
AGCAAAGTCGGCTTTCCATGTAGTGAAGGAGTAACTGACGTTGGACTGGTTTCCAGAGTCTAGACC
TATGTCCAGTGCGCCAGCACCTCTAGACTAGTGACCTGCGTGAAGAGGCACCACCTGGAGCTGGGA
CAGGGTGTGTGAGGCAGACATACCTTGAAGCACAGGGCAGATTAAGTGAAGCTCCAGCAAAAATCGG
GTTCTACTGCATGTTCTTTCTCTATTAACGTTGCTGGCAAGAGACAAGGTCCAGTTTTCCCCAAACC
CAGGAGCAGCAAGCTAAGTAAACGTTGGCTGAGCAGTTTGTAGGGGCTTCTTTTTAATCAGGCTCTT
TAAGCTGGGCTCACAGCTCTGCTGTGCACCTGCTGTGTGAACGGGGGCGAACCCCGCCGTCTGTCTG
AGCCCCAGTTTCCCTGCACGTCAGTCGTGGAGGAATGTGGTCCGAGGGCATAGATTGAGAGTTGC
CAGGAGGGTAGTCTTTTCTCTCAGTAAACTCACACACAGGCCACAGGCCTTCTGTGAGGTGAGG
AGGTGTTAGCCAACAAAGGAAATGAGGGACGAGGGAGGAAAGAAAACAGGGAGACGCCAAGT
CTCCTTCAAGTGAAGAGTGCATTCCTCCTTCAACCTGGTCTCCCGCTGGATGCCAGCTTGTCTGT
GGCTCTGGAGGGCCCGAGCCCTTCCGCCAGGCTGGTGCACCCAGGGGCTGACTGGACACACCCT
GCGGGGCTGGATGGACTGTCTGGCTGCCATCTGATTCTTCTTTGCAAATACAGGTTGCCAGGTGACA
GGAACCTTCTATGCTTGTGCCCGCCTGAGTCCCAGGCCCCCGGGATCCCCATAGAGCCAAGCATA
AGGTCTGCTGAAGCCTTGGCGCTCTCAGGTGAGTGGGGGGCCCCGAGGCGGCGTCTGCAGGCTCCC
CTCGCTGCTGGGTGGATTTGAGGGGTCAGTGAGCACAGCTGGGCCCCGAGCAGTGACGCCCTGAC
CCCCGACCGTGAGCGAGGTTGGAAGGTTAGCAGGGGGAGGAGGGCTCCGATCCTGGTCAATCCTCT
AATCTGCCTCCACCGCTGGTCCCACCTGGCCCCGCTGGAGGCTGACCTTGCAGGAGTGTGCAGACCC
CCGGTGCATTCTCCAGGCCCTCTGCAGCCGGCACCTCGCGGCACGGTAGGCTCCTCAGAGCAGA
GCGCGGGGCTCCTAGAAAGAGCAACCAGGGGCTTCGTACGCTTCCCGCGGACACTAGCCCTGGGT
CCTTCTCACTGTGTGCGCTGCCGAGGAGACAAGCGTGGTGGCCTCCCCCTGAACTTGATGTGTCT
GCAGACAAACATGGATTGATCTGGTTTTTAAAGTTTCATTTCTAAAAGACTCCCTGCAGCTTGGAG
ACCATGCCTGTTTTAAGGAAGGCACCCCAAGGCTCACTGCACTTGCCTGGTGTATGTGTGTTTGT
TTAGATAATGTTCTGATTTTTTTAGGTGGGATTTGTGTTAATATTA AAAACTGAATAGCTAAGCCCCC
GCCTTGCCCCCGCCTCTTTGAAGATGAGCCACAGAAAGTGTAAGCCGAGTTCTCGAGGTTCCGGG
AGGTGAGAGCCGGGCTGTCCTCGCCCCAGGGGCTGGGCCTCCACGCACGGACCTTCTGGTGCC
GCGGCTCTGCAGGAGTCTCGCCGGCCCTGGACGTATCAGGGAGGAGGGCTTCTGAACAGAAAGGC
CTGTGTGTGTTTTTAGAAACTTTCAAACCTTTTCTTGAACACCTCAGGCTTGTGTGGGTCCCTGAAG

AGTAGGAAATAGATAGCTATTTATATCCCTGTGACCTCGTGATTCTGATGACGTTCAATGAAATGA
AACCTCTAGTGGCCGACACCCACTCCTGGGGCTCAGAGCAGCAGAAGTCGAAGGGGAGGCTCGAG
ACAGTGATGTGGGTTGTCTGAGTGTCAAACCTGCCATTGAGGAACAAGAGGCTTTTGTGGGTTTCC
CTGGGCACACAGTTCAGCTAAGTCCCAGCCTCGCCAGCTCAGCAGAGGACCGCCGTCCTCGTGGT
GAGCCTGCACGGTCACTTAGGACGGGTGAAGCTCCTCGGCCTTTCAGATCAGGGCACCTCTCCAGC
CTGGCTTGGTCCCTCAGCCTGTGGGTTGTATTTAAAGAAGGTTCTGAAATCAACGAAATTTTAAA
AATTAGTTCATCTTGTGTTGACGTTTGAGGAAGTGAAGTTCTAGAGCCAACTCAAACACAAAGTGTC
AGCCCTGGGAACATGGCCCTCAAAAGGTAATTCGTTAAGCAAGTGGTACATTAACAGTGGAAAAA
TAATTTAAAAATCAGAAAAGCAACAATGAAAAACGATAGTGTACAGTCCCACCGCCAGAGAGC
ACCACCGTCCCAGGGCTTCTGCGTGTGCGTGTGCGTGTGGGGAGCACCATCCTGACACTTCAGGGCG
GCTTCAGGTGTGTGAAATATTTGCTTTTTTCTCAAACACCATTGTACTTTTTTGTGTAAGTTGA
ACTTAGGGTTTACTTCTTCCAAAATCAGAACTGCTTGTCTGGCTTAAAATGCATTTTTTGTCTCAGCAG
CACAGGACTTAGTGTATTGGAGACGAGTGTCTCGTCACCAGTGTGGTGCCCGCCAGCAAAAAG
TAAATCCGTGTATGTGTGTTGAAAGTGGCCAGTATAGAGGGCAGTGAGGAGACTCCTGGCAGAG
GTCTCCACCTCCCTCCGAGTCCCAGGAGGGACGTGAGTCTTGCAGGGTCTCTTGCCCCCTCAGCA
ACGTCACCAGATGCCCTCGCCCTGGTCAGCGGCTTGGCTCCGGGGCGGGGTCCGGCGCGGC
GCGGCTCCTCAGCGCTGACCTGGAACCTTGTGTTGCAGACTGCCGGCTCCACATCTGCCTCTACTA
CCGGGAGGTCTGGTGAAGGAGCTGACCACGTCCAGCCCTGAGGGCTGCCGGATCTCCCATGGGCA
CACCTACGATGCCAGCAGCCTGGACCAGGTGCTTCCCTTCCCGGAGGACAGCGGCCATCGGAA
GAACATCGAGAAGCTGCTGGGCCACCTGGAAAGGGGTGTGGTCTCTGGGTGGCCCCGACGGGCT
TTACGCCAAGAGACTGTGCCAGAGCAGGGTCTACTGGGACGGGCCCTGGCGCTGTGCAGCGACCG
GCCAACAAGCTGGAGAGAGACCAGACCTGCAAGCTCTTCGACACTCAGCAGTCTTGTGAGTGA
GGCCGCTGATCTCCGTGAGGATGGAGGTCTGGGGGGAGGACCTGCCTCAGGGGTCTTCCGTCTGT
AACCCCGGGCCTGCCGGCAAGGCCCCAGGGTAGGTTTCTGGGGGGCTCGCTGTACCCCCATCAG
CAGAGGCGTGTGAGAAGGAGGCTGACCTCAGGAGGACTGTGGTTCAGGCTGAGGTCTCGAAGTCT
GGTGTTCACCAAGTACTCACCAGCTAACAAGGCTCACATCTGGCTGGCAGTGTGGCCTCAGCGAGC
ATGCTGCCGATGTTTTGGCTCCTTTAAGTTTCTAGAAAATTGTAAGGTTGGAAGTATGTTGTTAA
CACTCTGGCTGTGAGGTGTGTCACCCTCAAGAGAGGCCCTTCCAGCAGGTGGGACCAAGGCTGAGTG
TGTTGAACTGATTTTGCAGCAGGGAAGTTATGAGCTGTCTCTGTAGGTTTACATCACGTTTTCCAG
AACCAGTAGGTGTCGTGTCCTAGTTTTGATCTCGTGGTAGTTAGCTGAGCCCTGGGCTGGCTTTTGT
GGAGAGCGCTGGCCACCACACGGAGGAAGCTTTGCCCAATGTCCGTTTACGTCTGGACTCGTGTGTC
CTCTTCTGGGGCAGAAGCAGTTCCTCCGAGCGTCCGCATTGTGCTAATGACCCTGTGCAAGTGCCCC
TCCAGAAACTCTGTCTGCTGGGCTTTCTCGTGCCTCTGCTCTCCCTGAAGGTGCTGCTCAACTCCACT
CACGTCAAAGTAACAGGATGAGGCATCCTGGAGCCTCACTGCCGGAGGCACTTGTCAAATGTGGGG
TTGAAGTTGCCCAGTTTTGCTTGGGGTACCCAAATCTCTTTTTGTGCCGAAGCAAACGCATCCCC
AGACAACCGTCCCCTGCAGGGCCGACAAGAGGGAGAGCCGAGCCCTGGCACCCGAGGTGGGAA
GGCGCGGGGCTGCTGCTCCCGAGGCGGTGGGGCTGAGGCTCAGAAGGCACCGAGGGCGGGGCTC
GCTGGGTATGGGTCTCTCCGAGGCGGTGGGGCTGAGGCTCAGAAGGCACCGAGGGCGGGGCTC
TAACGGCAGGCCCCGGGAGTGGCCCTTCTTCCCGAGTCCCTCACACCTAGGAAGGGGGCCTCCT
CCCTTCTGGCCAGGCGAGAAGCTGCGCCTGAGCCTCGGGCCTGGAGGGCTGCACTCACTTACGTT
TTATCTGTGAGCAAGGGCTGTTTTGCTTTTTCTTCTCTGTGACCCAGGGCTGTGCCCTTAGCCAGT
GCTGCCTTTTTTATATCCTGAGGTGTACTGAGGTTCAAGAGGCCTGTGAGCTCAGAACTGCAGCT
GCGCAGAGCAGCCCTCCAGCGAAGGGCTCCCACGAGTGTCCGAGGTTACCGGCCTTACAGAGAAC
CGTGCCACCGTGCCCTGCGAGCAGCCTGTGTGGTGTGGGCGCCTCTGCCACCTCGCAGCGTGGA
GCCTTTCACATGTTCTGACTAAGCCGTTGGGTTTGAATTTGAAATTCTGGAAGACAAAAGAAAAGCA
GGAAGTCAAATGGTCCACTGAGTTAGCTAGAACTTTTCTTCAGTTGAAGAGAACAGTGGAATCT
TTGATATCTGCCCTTTCAGGACCTGCCGGTCCGGGGACAGCCCAAGGGGCCCCGGGGTGTCTCATCT
GATAAGAAGGCAGCCGAGCTCTGCAGACGTGACATCTGGCTGTAGCAGGAGGGCAGGGCCAGCC
GGGGCACTGTACCCTGACTGAGGCTGGGGGCCGGGGCCCCGAGGGGAGCACATGGCTCAGCGGT
GCCCCCTCGCGTGGCGGTATAGCCGCCGGGACACACCCACACCCACAGGCTCGCAGCCATCACCCC
CACCCAGTCTCAAACCCATGGCAAGAAGTCAGCCAGAGTCAGTTTGGGATGCAGCTGCCACGG
CTGGGGCTGAGTCTCCGCTTGGCGGTGTCTGCGTCGCGCCTGTGGAGGTCCCGGTGGCGAGGACG
GATTAAGGGCTCAGCAGTTTTGAGATGAGGTTTCATGAGTAGACCAGGGTCAAATCAGACCATTCTA
TTTTTTTAAAGAGAATTTCTCTTTGGTATAAATTATTCTTGCCTCGATGTGGCTTCGCTTCCCTTTC
CTCCTCCTTCACTCTCTGCGCCTTTGCCTCCTCACGGGTACCAGCTGCAAAGTGCAGGCCCTG
GTCTTAGGCTGCGTCCGCTCGAGGTGAAGGCGGGAGCCTGCGGGAGGGACTCCATGAACGCGCGGT

GGTCCTGCCCTCCCTGCCTCCTGCCCTGGTCCCTGAGTAGGCGTGGGCTCCCTGCTCCAGCCTGCATC
 CCATCCCTGTGGGGTTCTGAACGCCTCTCTTGTGGGTCCCTGCAGAGCTCCAAGCGTTCGCCACCA
 CGGCCGGCCTCTGCCGAGGTTCCAGGTGACTCTGTGCTTCGGGAAGAGTTTCCAGACCCTCAGAG
 GCAACGGAAGCTCATTACAGCTCACGTGAGTGTTCCTGCCTAATGATAGCGTTTCTTGCCCTGC
 ATGGAGAGCAAGTCCCGCTCAGAGAGGTTTCGGTTGAGACATGAGTGTCCAGTGACCAGGCAAAGC
 AGGTGCAGCAAGCAGCGCAGCCCAGCCCACCCACCTCCCGGGCGCCGTGACCCCGCGCTGCCGCC
 CGCCCGTGACCCCGAGCCCTGGCTGCATCCTTCCCTGTGTCCTTTGTTCTTCAAGGAAGTTGTGATC
 CCCCTTTGTGGGGATTAACAGGATGGAAGCTGAATGTTGCCCTTATAGAATCTTCCCCTTAATACT
 GCTTTTCAAGTGCTCATCTTCCCTTGGGGGGAGAAGCTTTTCCCAAAGTACTTTTGTGTATCTTGTA
 GGCCCTCCAGATGTTCCCGAGATCCTCTTTTATTTCTGAATTTTAAAAATTATTTAATTGCTGGAAA
 CCAAGAGCATGTGTTATCTGGAAGAAGCTAAACCGTTCAAGCATTTCGAATGGGTCAGCTCATCAC
 CAGGTTACCAGCAGTTAAGATGGGATTCACCCGTGGCAAGGAAACATTTACAAAAAAGGAAAG
 AAACGGGACTTAGATAAAATAACATTTAGCATTCCTTTGCCACAGAAAAACAGAGTTTGAATACTAA
 GATTTTGAACCTTGAATTTGAAGACTTTGCAATTCAGGCGTTATTAATGGGCCAGATAATG
 AGCAGTAACAGGTAAAAAATTACACCAAATAATAACAAAATTCAGGTGAGATTTTGTGATGATAC
 CGGTTCTTGTGAAATCTGACATAAAACACTGTCTAACGTGCGCTCTCTAATGCACCCCCCTTCCCT
 GATTGTAATAATCAAAAAACAACCAACCAATAAAACAAAAGTATAGTCCCCATAAACTTTAGGGTTTT
 CTCACAAGTTCTTCCCGGATCGATAACAATTGTTGATTTAGTAAGTACTGATCCTTGTAAACAAGTCA
 AAGGACTAAAGCATCTTGGCCCTGGGAGATAGCATCTCAGACGGCAATGGTGACCCCGAGCCTGTG
 GAGCTGGACACACTGGCCCTGGTTGGGCAAGGATTGTCCCAGCCGGGATCCCGAAATCGAGGGGA
 TGGAAGGTGGACGTGGGAACACTCCGGAGTTCTGCTCCTTTTAACTATGGATGTATTTAGTTACTT
 CCTGTGAGGCATGCTTAAGTCGGTCTGTCTCAATAACACCAAGGCTCAATTAACAGCACACTTGAT
 TGGCTGAAAGAAAGCATTTCGGTTTTCTTAGACACTTAGGTTTCAGGAAGAGCTGAATGTTGACTATTT
 GTTTGGTGAACGTGGTCTACACTAATAACCAAACTTGATGAATTTGGGATCAGTTAACTTCTTTTTT
 TTCACAATATCAGTTTGTTTTTGTTTGTGATTTTGTGCTTTTTTTTTTCAAATCTTTGGTTTAGAAATATG
 CAGATTATCCAGGTTGCCATGAATTGTGAGTCCCTGAGCCCTCAGGCCTGTCAGACTGCAGGTGTG
 GAAATATAAATCCATTGGCCTAAATTACCTGATTGCCTCAAACCTACTTTTAAATTTGGTTGTTCTTGC
 CTGATTTGCTTCAGTCTTAGTTAAACGTGAATTTACAGGCAGCAGTTGGTTTACAGATGCCATCTCTAC
 CTGTCCTGTCAATTGAAACCCAGAGTTAAGGAGGTTCTGTTTATAGGCTGGTGCATGTAACAGAAAG
 TTAGTTCTCCAGAAGCCCCAGTGGGACTTGTCTGGTGTGTTACGAACCTGCACCTGGACCTCACC
 CTCAGCTGTGGAGGCTGCCGCACGGAGTCAGAAGGAGTAGCTCAGTAACGCTCTCTTAAAAATCTT
 CTGTTGAAGGTTGAACCTCTCCTCGCCAGGCAGCTGTATTACTTCGCTCAGCAGAACAGCGGGCACC
 TCCTGAGGGGCTACGACTTACCTGAGCACGTGGGCAGCCCGGAGGATTACCACAGGTCCATCCGCC
 ACTCCTCCATCCAAGAGTGAGGACCGTCAGGCCAGACACTGTGCTGTAAATACCTGTCCTAGGACA
 GCTGATGGGACCCCACTTTCTTTTCGGGAACCCGGGGCTTCAGTTCAACACTTGAGGGGAACGT
 GTGGAGAGCTGCCCCATGTGACTGACAGACGAAAGGGAGCACCACACCAGCACCCTGTCAGACC
 CCGCGCTGACGAGAATGTGAAAAGCACAAAATCAGTTTATGTTTACCAAAGTGCCGTCTTCAGTTT
 GATGTGACTCTCTTGCCTGAAGCCTGAGAAAACCTTTACCAGTGCTGACCACGAGGAAGGGTC
 CGAGAGCCCGCTGTATCTCAGGGAAGTAAAACCAAGTTTCCGCCCAAGAGAAATGGACCGATA
 CCTGAAACAGACTCTGCCTGAGGGCATCACTCC

Leyenda	
1	RNA
2	Intrones
3	Exones(CDS con traducción de proteínas)
4	Primer N°1 Forward y Revers
5	Primer N°2 Forward y Revers
6	Primer N°3 Forward y Revers
7	Primer N°4 Forward y Revers
8	Primer N°5 Forward y Revers
9	Primer N°6 Forward y Revers

10	Primer N°7 Forward y Revers
11	Primer N°8 Forward y Revers
12	Primer N°9 Forward y Revers
13	Primer N°10 Forward y Revers
14	Primer N°11 Forward y Revers
15	Primer N°12 Forward y Revers
16	Primer N°13 Forward y Revers
17	Primer N°14 Forward y Revers
18	Primer N°15 Forward y Revers
19	Primer N°16 Forward y Revers

Anexo 2. Tabla de datos de alpacas de color blanco

ALPACAS COLOR BLANCO											
N°	Ion code	No mbr e	Número de arete	Raza	Alpaca de color	Ubicación de muestras	Variantes	Heterocigotos	Homocigotos	No llamado	Abse ntes
1	107		72	Huacaya	Blanco	Fundo Oquem arca	42	0	0	17	25
2	124	Nin a	657	Huacaya	Blanco	Fundo Oquem arca	71	0	0	71	0
3	126	C.C.		Suri	Blanco	Fundo Oquem arca	68	4	1	3	60
4	127	68 173 8		Huacaya	Blanco	Fundo Oquem arca	70	1	0	37	32
5	129	66	1046	Suri	Blanco	Fundo Oquem arca	71	18	1	6	46
6	130	38	664	Huacaya	Blanco	Fundo Oquem arca	71	1	1	2	67
7	131	Abu elo	37 1042	Huacaya	Blanco	Fundo Oquem arca	0	0	0	0	0
8	133	52		Suri	Blanco	Fundo Oquem arca	71	1	1	2	67
9	134	MD -21	68-12	Huacaya	Blanco	CICAS La Raya	71	0	1	3	67
10	137	MD -420	042- 150	Huacaya	Blanco	Fundo Chaupi Wasi	71	2	0	34	35
11	139	MD -57	5608	Huacaya	Blanco	Fundo Chaupi Wasi	71	0	0	33	38
12	142	MD -26	B503 65	Huacaya	Blanco	Fundo Chaupi Wasi	71	0	0	71	0

13	142		77-12	Huacaya	Blanco	Fundo Chaupi Wasi	71	1	0	36	34
14	143	93-13	66	Huacaya	Blanco	Fundo Oquem arca	73	5	11	35	22
15	146	MD-22	40-12	Huacaya	Blanco	Fundo Chaupi Wasi	71	3	1	46	21
16	147	MD-33	B133 6-a	Huacaya	Blanco	Fundo Chaupi Wasi	71	2	2	38	29
17	148	MD-350	57040	Huacaya	Blanco	Fundo Chaupi Wasi	71	3	1	43	24
18	149	D40 176		Huacaya	Blanco	Fundo CAP Huaycho	76	12	2	55	7
19	152	280	62-130	Huacaya	Blanco	Fundo Oquem arca	76	6	0	59	11
20	181	Hua reño		Suri	Blanco	Fundo Oquem arca	71	2	1	66	2
21	182	Que ña	B126 8	Suri	Blanco	Fundo Oquem arca	71	3	1	2	65
22	183	MD-040	060-150	Huacaya	Blanco	Fundo Chaupi Wasi	71	0	0	71	0
23	184	MD-75	269-13	Huacaya	Blanco	Fundo Chaupi Wasi	71	2	3	45	21
24	185	38-006 4		Huacaya	Blanco	Fundo Oquem arca	44	3	0	37	1
25	186	MD-55	186	Huacaya	Blanco	Fundo Chaupi Wasi	70	0	8	41	21
26	189	MD-65	12113	Suri	Blanco	Fundo Chaupi Wasi	71	3	1	41	26
27	191	MD-62	B567	Huacaya	Blanco	Fundo Chaupi Wasi	71	3	1	45	22
28	201	LA C	EY	Huacaya	Blanco	Fundo Oquem arca	18	17	1	0	0

29	202	B13 36	MD	Huacaya	Blanco	Fundo Chaupi Wasi	16	12	4	0	0
30	203	XA VI	EY	Huacaya	Blanco	Fundo Oquem arca	16	16	0	0	0
31	204	68- 121 1	MD- 12	Huacaya	Blanco	Fundo Oquem arca	1	0	1	0	0
32	205	Pied ra	32	Huacaya	Blanco	Fundo Oquem arca	16	15	1	0	0
33	206	B13 41	MD- 41	Huacaya	Blanco	Fundo Chaupi Wasi	5	4	1	0	0
34	207	561 0	MD- 80	Huacaya	Blanco	Fundo Chaupi Wasi	18	17	1	0	0
35	208	571 4	MD- 29	Huacaya	Blanco	Fundo Chaupi Wasi	16	15	1	0	0
36	209	042- 15	MD 240	Huacaya	Blanco	Fundo Chaupi Wasi	4	3	1	0	0
37	210	031- 15	MD 48	Huacaya	Blanco	Fundo Chaupi Wasi	3	2	1	0	0
38	211	008- 150	MD- 410	Huacaya	Blanco	Fundo Chaupi Wasi	3	2	1	0	0
39	212	Chi nita	EY	Huacaya	Blanco	Fundo Oquem arca	16	15	1	0	0
40	267	62- 13	MD- 28	Huacaya	Blanco	Fundo Chaupi Wasi	4	4	0	0	0
41	268	B56 7	MD- 33	Huacaya	Blanco	Fundo Chaupi Wasi	1	0	1	0	0
42	269	MD -65	121- 13	Suri	Blanco	Fundo Chaupi Wasi	16	15	1	0	0
43	270	MD -76	81-13	Huacaya	Blanco	Fundo Chaupi Wasi	13	12	1	0	0
44	271	MD -63	135- 14	Suri	Blanco	Fundo Chaupi Wasi	17	16	1	0	0

45	272	B13 42	MD- 60	Huacaya	Blanco	Fundo Chaupi Wasi	16	15	1	0	0
46	273	Rosi ta	7	Huacaya	Blanco	Fundo Oquem arca	4	3	1	0	0
47	274	MD -31	268- 14	Huacaya	Blanco	Fundo Chaupi Wasi	4	3	1	0	0
48	275	MD -56	5123	Huacaya	Blanco	Fundo Chaupi Wasi	3	2	1	0	0
49	276	MD -66	93-13	Huacaya	Blanco	Fundo Chaupi Wasi	17	4	13	0	0
50	277	MD -26	B503 65	Huacaya	Blanco	Fundo Chaupi Wasi	21	1	20	0	0
51	278	MD -35	5704	Huacaya	Blanco	Fundo Chaupi Wasi	13	12	1	0	0
52	279	Juni or Pied ra	1006 - EY	Huacaya	Blanco	Fundo Oquem arca	20	19	1	0	0
53	280	MD -40	060- 15	Huacaya	Blanco	Fundo Chaupi Wasi	5	5	0	0	0
54	282	Ven gad ora	2	Huacaya	Blanco	Fundo Oquem arca	20	19	1	0	0
55	283	RIT TI	4	Huacaya	Blanco	Fundo Oquem arca	6	6	0	0	0
56	284	MD -27	5705	Huacaya	Blanco	Fundo Chaupi Wasi	2	1	1	0	0
57	285	MD -46	12923	Huacaya	Blanco	Fundo Chaupi Wasi	2	1	1	0	0
58	286	DIN A		Huacaya	Blanco	Fundo Oquem arca	1	0	1	0	0
59	287	MIS TI	1041	Huacaya	Blanco	Fundo Oquem arca	16	15	1	0	0
60	288	RJ1 034		Huacaya	Blanco	Fundo Oquem arca	1	0	1	0	0

61	289	Carridale	OO6	Huacaya	Blanco	Fundo Oquemarca	7	6	1	0	0
62	290	EQM	22580	Huacaya	Blanco	Fundo Oquemarca	1	0	1	0	0
63	291		1014	Huacaya	Blanco	Fundo Oquemarca	18	17	1	0	0
64	292	MD-12	68-12	Huacaya	Blanco	Fundo Chaupi Wasi	1	0	1	0	0
65	293	MD-41	OO8-15	Huacaya	Blanco	Fundo Chaupi Wasi	18	17	1	0	0
66	294	MD-50	O35-15	Huacaya	Blanco	Fundo Chaupi Wasi	16	15	1	0	0
67	295	C.C		Huacaya	Blanco	Fundo Oquemarca	4	3	1	0	0
68	296	MD-14	168-10	Huacaya	Blanco	Fundo Chaupi Wasi	18	17	1	0	0
69	342	Estrella		Suri	Blanco	Fundo Oquemarca	16	15	1	0	0
70	343	Oso	O27	Huacaya	Blanco	Fundo Oquemarca	2	1	1	0	0
71	344	Cucuchi	O14	Huacaya	Blanco	Fundo Oquemarca	2	1	1	0	0
72	345	Keña	B0268	Suri	Blanco	Fundo Oquemarca	4	3	1	0	0
73	355	Harño	11	Suri	Blanco	Fundo Oquemarca	4	3	1	0	0
74	356	MD-51	5609	Huacaya	Blanco	Fundo Chaupi Wasi	1	0	1	0	0
75	357	Hugo	EY	Huacaya	Blanco	Fundo Oquemarca	2	1	1	0	0
76	358	MD-59	46-13	Huacaya	Blanco	Fundo Chaupi Wasi	5	4	1	0	0

77	359	Churra	E. 508	Huacaya	Blanco	Fundo Oquemarca	3	2	1	0	0
78	360	52		Suri	Blanco	CICAS La Raya	1	0	1	0	0
79	380		1	Huacaya	Blanco	Fundo CAP Huaycho	4	3	1	0	0
80	381		2	Huacaya	Blanco	Fundo CAP Huaycho	5	4	1	0	0
81	382		3	Huacaya	Blanco	Fundo CAP Huaycho	16	15	1	0	0
82	383		4-307	Huacaya	Blanco	Fundo CAP Huaycho	2	1	1	0	0
83	384		5	Huacaya	Blanco	Fundo CAP Huaycho	18	17	1	0	0
Total							2299	491	123	939	743

Anexo 3. Datos de alpacas de color negro

ALPACAS COLOR NEGRO											
Nº	ION CO DE	NOM BRE	NÚME RO DE ARETE	RAZA	ALPA CA DE COL OR	UBICA CIÓN DE MUES TRAS	Variant es	Heterocigotos	Homocig otos	No lla ma do	Abse ntes
1	301		236-13	Suri	Negro	Fundo Oquem arca	16	15	1	0	0
2	302		H5199	Huaca ya	Negro	CICAS la Raya	2	1	1	0	0
3	303		H5870	Huaca ya	Negro	CICAS la Raya	20	19	1	0	0
4	304		S0396	Suri	Negro	CICAS la Raya	20	1	19	0	0
5	305		S0068	Suri	Negro	CICAS la Raya	20	1	19	0	0
6	306	Burro	60	Suri	Negro	Fundo Oquem arca	20	0	20	0	0
7	307		H6329	Huaca ya	Negro	CICAS la Raya	2	1	1	0	0
8	308		H0438	Huaca ya	Negro	CICAS la Raya	20	0	20	0	0
9	309		891	Suri	Negro	Fundo Oquem arca	4	3	1	0	0
10	310		H4682	Huaca ya	Negro	CICAS la Raya	20	0	20	0	0
11	311		H4718	Huaca ya	Negro	CICAS la Raya	1	0	1	0	0
12	312		H5071	Huaca ya	Negro	CICAS la Raya	19	19	0	0	0
13	313		H5506	Huca yo	Negro	CICAS la Raya	2	0	2	0	0
14	314		2823	Suri	Negro	Fundo Oquem arca	5	1	4	0	0
15	315		121	Huca yo	Negro	Fundo Oquem arca	2	1	1	0	0
16	316		SR0072	Suri	Negro	Fundo Oquem arca	6	5	1	0	0

17	317		S0261	Suri	Negro	Fundo Oquem arca	1	0	1	0	0
18	318		S0263	Huacayo	Negro	Fundo Oquem arca	2	1	1	0	0
19	319		H4958	Huacayo	Negro	CICAS la Raya	18	16	2	0	0
20	320		S0266	Huacayo	Negro	CICAS la Raya	20	20	0	0	0
21	321		H4632	Suri	Negro	CICAS la Raya	18	16	2	0	0
22	322	Mach o	89	Suri	Negro	Fundo Oquem arca	13	13	0	0	0
23	323		H5871	Huacayo	Negro	CICAS la Raya	11	11	0	0	0
24	341		S0249	Huacaya	Negro	CICAS la Raya	3	2	1	0	0
25	342	Ajustado		Huacaya	Negro	Fundo Oquem arca	4	3	1	0	0
26	343		H4690	Huacaya	Negro	CICAS la Raya	18	17	1	0	0
27	344		S0293	Huacaya	Negro	Fundo Oquem arca	19	18	1	0	0
28	345		SURI	Suri	Negro	Fundo Oquem arca	18	18	0	0	0
29	346	Manchas		Huacaya	Negro	Fundo Oquem arca	4	3	1	0	0
30	347	Negro	600	Suri	Negro	Fundo Oquem arca	20	1	19	0	0
31	348		H4678	Huacaya	Negro	CICAS la Raya	3	2	1	0	0
32	349		H4976	Huacaya	Negro	CICAS la Raya	2	1	1	0	0
33	350		OO89	Suri	Negro	Fundo Oquem arca	16	15	1	0	0
34	351		H0249	Huacaya	Negro	CICAS la Raya	2	1	1	0	0
35	352		H5747	Huacaya	Negro	CICAS la Raya	1	0	1	0	0
36	353		S0411	Suri	Negro	CICAS la Raya	19	18	1	0	0

37	355		215	Huaca ya	Negro	Fundo Oquem arca	2	1	1	0	0
38	356		309	Huaca ya	Negro	Fundo Oquem arca	18	17	1	0	0
39	357		H4256	Huaca ya	Negro	CICAS la Raya	2	1	1	0	0
40	358		S0236	Suri	Negro	CICAS la Raya	17	16	1	0	0
41	359		H2008	Huaca ya	Negro	CICAS la Raya	1	0	1	0	0
42	360		H4646	Huaca ya	Negro	CICAS la Raya	20	19	1	0	0
43	361		166	Huaca ya	Negro	CICAS la Raya	4	3	1	0	0
44	362		H4678	Huaca ya	Negro	CICAS la Raya	3	2	1	0	0
45	363		H4533	Huaca ya	Negro	CICAS la Raya	4	1	3	0	0
46	364		359	Huaca ya	Negro	Fundo Oquem arca	2	1	1	0	0
47	365		334	Huaca ya	Negro	Fundo Oquem arca	4	3	1	0	0
48	366		H0716	Huaca ya	Negro	CICAS la Raya	2	1	1	0	0
49	367		H4056	Huaca ya	Negro	CICAS la Raya	3	2	1	0	0
50	368		H4905	Huaca ya	Negro	CICAS la Raya	2	1	1	0	0
51	369		S0271	Huaca ya	Negro	CICAS la Raya	4	3	1	0	0
52	370	Toma sa		Huaca ya	Negro	Fundo Oquem arca	16	15	1	0	0
53	371		119-14	Huaca ya	Negro	Fundo Chaupi Wasi	1	0	1	0	0
54	372		235-13	Huaca ya	Negro	Fundo Chaupi Wasi	4	3	1	0	0
55	373		235	Huaca ya	Negro	Fundo Oquem arca	4	3	1	0	0

56	374		H4676	Huaca ya	Negro	CICAS la Raya	2	1		0	0
57	375		H6021	Huaca ya	Negro	CICAS la Raya	24	23	1	0	0
58	376		S0242	Huaca ya	Negro	CICAS la Raya	1	0	1	0	0
59	377		1334	Huaca ya	Negro	Fundo Oquem arca	19	18	1	0	0
60	378		225	Huaca ya	Negro	Fundo Oquem arca	2	1	1	0	0
61	379		S0247	Huaca ya	Negro	CICAS la Raya	4	0	4	0	0
62	380		S0260	Huaca ya	Negro	CICAS la Raya	3	0	3	0	0
63	381		829	Suri	Negro	CAP Huaych o	16	15	1	0	0
64	382		892	Suri	Negro	CAP Huaych o	16	15	1	0	0
65	383		44	Suri	Negro	CAP Huaych o	18	17	1	0	0
66	384		1	Huaca ya	Negro	CAP Huaych o	20	19	1	0	0
67	385		2	Huaca ya	Negro	CAP Huaych o	19	19	1	0	0
68	386		3	Huaca ya	Negro	CAP Huaych o	16	16	1	0	0
69	387		01 92	Huaca ya	Negro	CAP Huaych o	17	16	1	0	0
70	388		5	Huaca ya	Negro	CAP Huaych o	1	0	1	0	0
71	389		6	Huaca ya	Negro	CAP Huaych o	4	3	1	0	0
72	390		7	Huaca ya	Negro	CAP Huaych o	4	3	1	0	0

73	391		8	Suri	Negro	CAP Huaych o	21	1	20	0	0
74	392		9	Suri	Negro	CAP Huaych o	17	16	1	0	0
TOTAL							728	518	211	0	0

Anexo 4. Datos de alpacas de color marrón

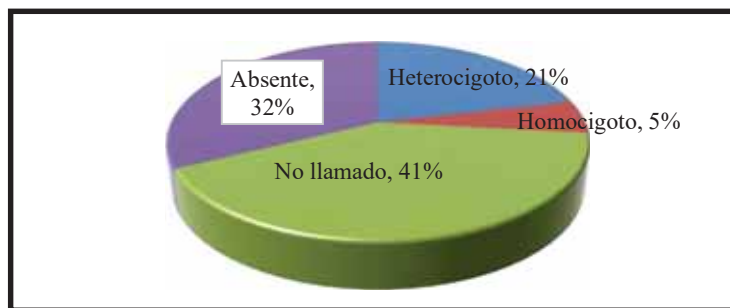
ALPACAS COLOR MARRÓN											
Nº	Ion code	Nombre	Número de arete	Raza	Alpaca de color	Ubicación de muestras	# de SNPs	Heterocigotos	Homocigotos	No llamado	Absentes
1	102	Puca Rumi	63 pucarumi1040	Suri	Marrón	Fundo Oquemarca	42	13	2	0	27
2	103	Rojizo	62	Suri	Marrón	Fundo Oquemarca	43	2	0	19	22
3	104		612	Huacaya	Marrón	Fundo Oquemarca	42	1	0	19	22
4	105	Vino	2821	Huacaya	Marrón	Fundo Oquemarca	43	1	0	2	41
5	110		199-15 MD-49	Huacaya	Marrón	Fundo Oquemarca	71	1	1	6	63
6	111		1030	Suri	Marrón	Fundo Oquemarca	72	1	1	8	62
7	114		614	Huacaya	Marrón	Fundo Oquemarca	71	1	1	25	44
8	118	Keta	440	Huacaya	Marrón	Fundo Oquemarca	71	16	0	20	35
9	121	Osita	13	Huacaya	Marrón	Fundo Oquemarca	71	16	1	8	46
10	123		16	Huacaya	Marrón	Fundo Oquemarca	71	3	1	38	29
11	124		261.14 MD-16	Suri	Marrón	Fundo Oquemarca	71	0	0	54	17
12	125	Flor	1	Huacaya	Marrón	Fundo Oquemarca	71	16	1	4	50
13	125		5724 MD-25 (2)	Suri	Marrón	Fundo Oquemarca	71	13	1	6	51
14	127		610	Huacaya	Marrón	Fundo Chaupi Wasi	71	1	0	38	32

15	128		B1267	Huaca ya	Marrón	Fundo Chaupi Wasi	71	5	2	40	24
16	129	Vino Viejo		Huaca ya	Marrón	Fundo Chaupi Wasi	71	1	1	34	35
17	130	Carpi	1	Suri	Marrón	Fundo Chaupi Wasi	71	18	1	2	50
18	130		181-15 MD-44 (2)	Huaca ya	Marrón	Fundo Chaupi Wasi	71	0	0	69	2
19	132	Herma na Oso	45	Huaca ya	Marrón	Fundo Chaupi Wasi	71	0	1	38	32
20	135		47 015	Suri	Marrón	Fundo Chaupi Wasi	71	3	1	50	17
21	137	Campi ta	14	Huaca ya	Marrón	Fundo Chaupi Wasi	71	2	0	34	35
22	140		5752 MD-52	Huaca ya	Marrón	Fundo Chaupi Wasi	71	4	0	48	19
23	143		31-14 MD-78	Huaca ya	Marrón	Fundo Chaupi Wasi	73	3	13	33	24
24	150		H4661	Huaca ya	Marrón	Fundo Chaupi Wasi	76	6	2	61	7
25	153		187-15 MD-74	Huaca ya	Marrón	Fundo Chaupi Wasi	73	2	0	65	6
26	154		42(0061 0) (1)	Suri	Marrón	Fundo Chaupi Wasi	75	9	0	62	4
27	154		H4259 (2)	Huaca ya	Marrón	Fundo CAP Huaych o	75	9	0	62	4
28	155	Herma na de Osita	45 (1)	Huaca ya	Marrón	Fundo CAP Huaych o	71	0	1	40	30
29	155		H4650 (2)	Huaca ya	Marrón	Fundo CAP Huaych o	73	7	1	60	5
30	156	Osita	46 (1)	Huaca ya	Marrón	Fundo CAP Huaych o	71	16	1	2	52
31	156		H5761 (2)	Huaca ya	Marrón	Fundo CAP	72	2	0	70	0

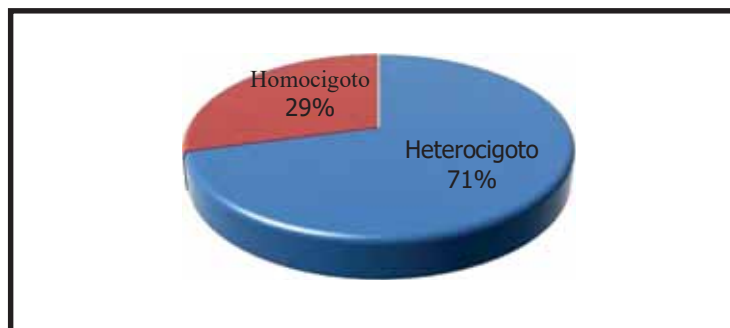
						Huaych o						
32	157	Denisse	47	Suri	Marrón	Fundo CAP Huaych o	73	1	2	63	7	
33	163	Corani	A-11	Huaca ya	Marrón	Fundo CAP Huaych o	71	0	1	39	31	
34	174	Eliza	8	Suri	Marrón	Fundo CAP Huaych o	70	0	0	70	0	
35	175		16513	Suri	Marrón	Fundo CAP Huaych o	42	2	1	2	38	
36	175		H4523 03-11	Huaca ya	Marrón	Fundo CAP Huaych o	71	0	0	70	1	
37	185		3-14 MD70	Huaca ya	Marrón	Fundo CAP Huaych o	71	1	1	41	28	
38	188		31-14 MD20	Huaca ya	Marrón	Fundo CAP Huaych o	71	4	1	1	65	
39	201		HR0078	Huaca ya	Marrón	Fundo CAP Huaych o	71	18	1	3	49	
40	203		H5874	Huaca ya	Marrón	CICAS La Raya	71	16	1	10	44	
41	204		S0287	Huaca ya	Marrón	CICAS La Raya	71	1	21	6	43	
42	205		H5265	Huaca ya	Marrón	CICAS La Raya	71	1	21	2	47	
43	206		H4711	Huaca ya	Marrón	CICAS La Raya	72	4	1	2	65	
44	210		H5513	Huaca ya	Marrón	CICAS La Raya	71	3	1	1	66	
45	211		S0290	Suri	Marrón	CICAS La Raya	71	16	1	1	53	

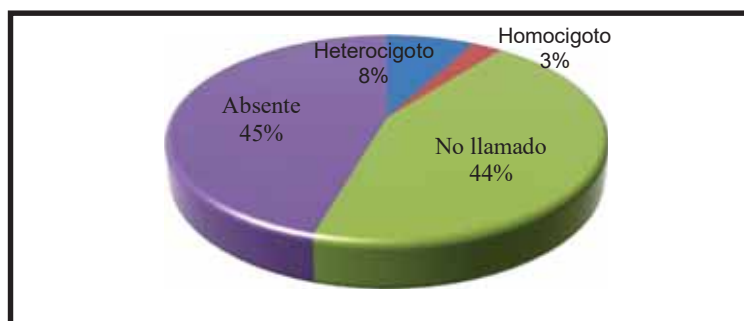
46	213		HR0049	Huacaya	Marrón	CICAS La Raya	71	1	4	38	28
47	215		H4715	Huacaya	Marrón	CICAS La Raya	71	3	1	3	64
48	218		H5730	Huacaya	Marrón	CICAS La Raya	71	18	1	7	45
49	219		HR0079	Huacaya	Marrón	CICAS La Raya	72	17	1	6	48
50	237		S0263	Suri	Marrón	CICAS La Raya	71	0	0	71	0
51	239		H5032	Huacaya	Marrón	CICAS La Raya	71	2	1	44	24
52	241		H5201	Suri	Marrón	CICAS La Raya	71	3	2	59	7
53	244		H5072	Huacaya	Marrón	CICAS La Raya	71	1	1	50	19
TOTAL							3644	284	97	1606	1659

Anexo 5. *Figura de porcentaje de variantes en alpacas de color de fibra blanco*



Anexo 6. *Figura de porcentaje de variantes en alpacas de color de fibra negro*



Anexo 7. *Figura de porcentaje de variantes en color de fibra marrón***Anexo 8.** *Tabla de exones e intrones en alpacas de color blanco*

ALPACAS DE COLOR BLANCO					
Exón/Intrón	SNP	MNP	DEL	INS	TOTA DE VARIANTES
Exón 1	2	0	0	0	2
Exón 2	2	1	0	0	3
Exón 3	0	0	0	0	0
Exón 4	0	0	0	0	0
Exón 5	0	0	0	0	0
Exón 6	1	0	0	0	1
Exón 7	3	0	0	2	5
Exón 8	2	0	1	1	4
Exón 9	1	0	0	0	1
Exón 10	3	0	0	0	3
Intrón 1	1	0	0	0	1
Intrón 2	2	0	0	0	2
Intrón 3	2	0	0	0	2
Intrón 4	15	1	0	0	16
Intrón 5	1	0	0	0	1
Intrón 6	6	1	1	0	8
Intrón 7	10	1	2	1	14
Intrón 8	11	1	4	0	16
Intrón 9	8	2	2	0	12
TOTAL	70	7	10	4	91

Anexo 9. *Tabla de exónes e intrones en alpacas de color negro*

ALPACAS DE COLOR NEGRO					
Exón/Intrón	SNP	MNP	DEL	INS	TOTAL DE VARIANTES
Exón 1	0	0	0	0	0
Exón 2	0	0	0	0	0
Exón 3	0	0	0	0	0
Exón 4	0	0	0	0	0
Exón 5	0	0	0	0	0
Exón 6	1	0	0	0	1
Exón 7	0	0	0	0	0
Exón 8	1	0	0	0	1
Exón 9	0	0	0	0	0
Exón 10	1	0	0	0	1
Intrón 1	0	0	0	0	0
Intrón 2	3	0	0	0	3
Intrón 3	1	0	0	0	1
Intrón 4	3	0	0	0	3
Intrón 5	1	0	0	0	1
Intrón 6	5	1	1	0	7
Intrón 7	9	0	0	0	9
Intrón 8	5	0	1	0	6
Intrón 9	7	0	1	0	8
TOTAL	37	1	3	0	41

Anexo 10. *Tabla de exónes e intrones en alpacas de color marrón*

ALPACAS DE COLOR MARRON					
Exón/Intrón	SNP	MNP	DEL	INS	TOTAL DE VARIANTES
Exón 1	2	0	0	0	2
Exón 2	2	1	0	1	4
Exón 3	0	0	0	0	0
Exón 4	2	0	1	0	3
Exón 5	0	0	0	0	0
Exón 6	1	0	2	0	3
Exón 7	3	0	0	2	5
Exón 8	3	0	0	0	3
Exón 9	1	0	0	0	1
Exón 10	4	0	0	0	4
Intrón 1	1	0	0	0	1
Intrón 2	2	0	0	0	2
Intrón 3	2	1	1	0	4
Intrón 4	10	0	0	0	10
Intrón 5	1	0	0	0	1
Intrón 6	7	1	1	0	9
Intrón 7	9	0	0	0	9
Intrón 8	11	1	2	0	14
Intrón 9	7	3	2	1	13
TOTAL	68	7	9	4	88

Anexo 11. *Tabla de exónes e intrones en alpacas en el total de alpacas estudiadas*

TOTAL DE ALPACAS					
Exón/Intrón	SNP	MNP	DEL	INS	TOTAL DE VARIANTES
Exón 1	2	0	0	0	2
Exón 2	3	1	0	1	5
Exón 3	0	0	0	0	0
Exón 4	1	0	1	0	2
Exón 5	0	0	0	0	0
Exón 6	2	1	1	0	4
Exón 7	3	0	0	2	5
Exón 8	3	0	1	1	5
Exón 9	1	0	0	0	1
Exón 10	3	1	0	0	4
Intrón 1	1	0	0	0	1
Intrón 2	3	0	0	0	3
Intrón 3	2	0	1	0	3
Intrón 4	16	1	0	0	17
Intrón 5	1	0	0	0	1
Intrón 6	7	1	1	0	9
Intrón 7	11	1	2	1	15
Intrón 8	11	1	4	0	16
Intrón 9	8	2	2	1	13
TOTAL	78	9	13	6	106