

UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA

LA MOLINA

FACULTAD DE ZOOTECNIA



**“IDENTIFICACIÓN BIOINFORMÁTICA DE POLIMORFISMOS DE
NUCLEÓTIDO SIMPLE EN GENES CANDIDATOS A LAS
CARACTERÍSTICAS DE LA FIBRA EN ALPACAS (*Vicugna pacos*)”**

TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO DE

INGENIERO EN ZOOTECNIA

ALVARO GONZALO FERNÁNDEZ SUÁREZ

Lima - Perú

2018

**UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA
LA MOLINA**

FACULTAD DE ZOOTECNIA

**“IDENTIFICACIÓN BIOINFORMÁTICA DE POLIMORFISMOS
DE NUCLEÓTIDO SIMPLE EN GENES CANDIDATOS A LAS
CARACTERÍSTICAS DE LA FIBRA EN ALPACAS (*Vicugna
pacos*)”**

TESIS PARA OPTAR EL GRADO DE INGENIERO ZOOTECNISTA

Presentada por:

ALVARO GONZALO FERNÁNDEZ SUÁREZ

Sustentada y aprobada ante el siguiente jurado:

Mg. Sc. Jorge Calderón Velásquez
PRESIDENTE

Ph.D. Gustavo Augusto Gutiérrez Reynoso
PATROCINADOR

Ph.D. Federico Abel Ponce de León Bravo
MIEMBRO

Mg. Sc. César Fernando López Bonilla
MIEMBRO

DEDICATORIA

- **De manera especial a mis padres Martha y Elias, por su amor y motivarme a cumplir mis metas.**
- **A Alma por brindarme su apoyo incondicional.**
- **A Melisa, Carmen, Pierina, Angela, Adriana, Remzi y Gerado por la mejor amistad que uno puede tener.**

AGRADECIMIENTOS

- **A mi asesor, el Dr. Gustavo Gutiérrez y el Dr. Abel Ponce de León, por su guía, apoyo y enseñanzas en el campo de la genética molecular.**
- **A los miembros de jurado Mg. Sc. Jorge Calderón y Ing. Cesar López.**
- **A mis compañeros de trabajo y amigos Manuel, Marcos, Mayra, Luis y Gonzalo por sus consejos y amistad.**

ÍNDICE GENERAL

I.	Introducción	1
II.	Revisión de literatura	4
	2.1 La alpaca	4
	2.2 Población de alpacas	5
	2.3 Estructura de la piel	5
	2.4 El folículo	5
	2.5 Genes relacionados al desarrollo de la fibra en el folículo piloso	6
	2.6 Polimorfismos de nucleótido simple	8
	2.7 Estudios con polimorfismos de nucleótido simple en alpacas	9
III.	Materiales y métodos	11
	3.1 Identificación de genes de queratina	11
	3.2 Análisis bioinformático	12
	3.2.1 Obtención de información básica de los genes de interés	12
	3.2.2 Descarte de secuencias compartidas con superfamilias	14
	3.2.3 Identificación de regiones no traducidas, exones e intrones	16
	3.2.4 Comparación de secuencias de interés	17
	3.2.5 Identificación de polimorfismos de nucleótido simple	19
IV.	Resultados y discusión	20
	4.1 Genes de queratina	20
	4.1.1 Queratinas del epitelio de tipo I	20
	4.1.2 Queratinas del epitelio de tipo II	25
	4.1.3 Queratinas de la fibra de tipo I	31
	4.1.4 Queratinas de la fibra de tipo II	34
	4.2 Desarrollo de haplotipos	36
	4.3 Discusión	37
V.	Conclusiones	41
VI.	Recomendaciones	42
VII.	Referencias bibliográficas	43
VIII.	Anexos	48

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1:	Genes de queratinas en los mamíferos	7
Tabla 2:	Genes codificantes de las proteínas asociadas a queratinas en mamíferos	7
Tabla 3:	Relación de genes de queratina	11
Tabla 4:	Ubicación de los genes de queratina del epitelio de tipo 1 y numero neto de polimorfismos de nucleótido simple ubicados.	22
Tabla 5:	Secuencia y ubicación de los polimorfismos de nucleótido simple hallados en genes de queratina del epitelio de tipo 1.	23
Tabla 6:	Ubicación de los genes de queratina del epitelio de tipo II y numero neto de polimorfismos de nucleótido simple ubicados.	27
Tabla 7:	Secuencia y ubicación de los polimorfismos de nucleótido simple hallados en genes de queratina del epitelio de tipo 2.	28
Tabla 8:	Ubicación de los genes de queratina de la fibra de tipo 1 y numero neto de polimorfismos de nucleótido simple ubicados.	32
Tabla 9:	Secuencia y ubicación de los polimorfismos de nucleótido simple hallados en genes de queratina de la fibra de tipo 1.	33
Tabla 10:	Ubicación de los genes de queratina de la fibra de tipo 2 y numero neto de polimorfismos de nucleótido simple ubicados.	34
Tabla 11:	Secuencia y ubicación exacta de los polimorfismos de nucleótido simple hallados en genes de la fibra de tipo 2.	35

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1:	Diagrama de la expresión de las queratinas en el folículo de la lana de oveja.	8
Figura 2:	Polimorfismo de nucleótido simple.	9
Figura 3:	Interpretación del código fasta.	12
Figura 4:	Región genómica, transcripciones y productos.	13
Figura 5:	Visualización de las superfamilias.	15
Figura 6:	Visualización de la secuencia del exón 1 del gen <i>KRT8</i> de ovino.	16
Figura 7:	Comparación del genoma de la Alpaca con el gen <i>KRT8</i> de ovino	18
Figura 8:	Visualización de 2 polimorfismos de nucleótido simple a partir del intrón 2 del gen <i>KRT 1</i> de ovino.	19
Figura 9:	Ubicación de los genes de queratina en el Scaffold 450 y los haplotipos obtenidos.	36
Figura 10:	Ubicación de los genes de queratina en el Scaffold 188 y los haplotipos obtenidos.	36
Figura 11:	Ubicación de los genes de queratina en el Scaffold 36 y los haplotipos obtenidos.	37
Figura 12:	Representación comparativa de localización cromosómica del cluster de genes de queratina flanqueados por los genes <i>KRT25</i> y <i>KRT17</i> .	39
Figura 13:	Representación comparativa de localización cromosómica del cluster de genes de queratina flanqueados por los genes <i>KRT80</i> y <i>KRT18</i> .	40

INDICE DE ANEXOS

Anexo 1:	Identificación de polimorfismos de nucleótido simple deseados y eliminados.	48
Anexo 2:	Ubicación de los polimorfismos de nucleótido simple predichos a partir de ovino, cabra y humano en genes queratina del epitelio de tipo I.	49
Anexo 3:	Ubicación de los polimorfismos de nucleótido simple predichos a partir de ovino, cabra y humano en genes queratina del epitelio de tipo II.	50
Anexo 4:	Ubicación de los polimorfismos de nucleótido simple predichos a partir de ovino, cabra y humano en genes de queratina de la fibra de tipo I.	52
Anexo 5:	Ubicación de los polimorfismos de nucleótido simple predichos a partir de ovino, cabra y humano en genes de queratina de la fibra de tipo II.	53

RESUMEN

El objetivo fue identificar y predecir la ubicación de polimorfismos de nucleótido simple (PNSs) en genes relacionados al crecimiento de la fibra. Se realizó el estudio con un total de 31 genes de queratina (*KRT9*, *KRT12*, *KRT13*, *KRT14*, *KRT16*, *KRT18*, *KRT20*, *KRT25*, *KRT1*, *KRT3*, *KRT5*, *KRT6a*, *KRT6b*, *KRT6c*, *KRT7*, *KRT8*, *KRT71*, *KRT80*, *KRT31*, *KRT32*, *KIRT40*, *KRT81*, *KRT82*, *KRT10*, *KRT15*, *KRT17*, *KRT19*, *KRT2*, *KRT4*, *KRT79* y *KRT83*) asociados con las características de lana, fibra y pelo en ovinos, cabras y humanos respectivamente, cuyas secuencias fueron encontradas en la base de datos del National Center for Biotechnology Information (NCBI). Mediante el uso de bases de datos y herramientas bioinformáticas como el Conserved Domains Database, Spling, y MegaBlast se logró ubicar secuencias únicas para cada gen. Estas secuencias fueron comparadas con los genomas de referencia *Vicugna_pacos-2.0.2* y *Vi_pacos_V1.0*. Se identificaron 48 PNSs ubicados en las regiones intrónicas y exónicas de 22 genes. No se localizaron PNSs en o alrededor de los genes *KRT10*, *KRT15*, *KRT17*, *KRT19*, *KRT2*, *KRT4*, *KRT6b*, *KRT6c* y *KRT79*. El análisis comparativo entre las cuatro especies estudiadas permitió observar que los genes *KRT81*, *KRT6b* y *KRT6c* no están presentes en los genomas de referencia de alpaca, los genes *KRT31*, *KRT14*, *KRT81*, *KRT83*, *KRT6b* y *KRT6c* no están presentes en el genoma de referencia de ovino y los genes *KRT31*, *KRT13*, *KRT81*, *KRT83*, *KRT6b* y *KRT6c* no están presentes en el genoma de referencia de cabra. Además, se logró asignar el cluster 450 al cromosoma 16 de alpaca.

Palabras claves: polimorfismo de nucleótido simple; queratina; haplotipo.

ABSTRACT

The objective was to identify and predict the location of single nucleotide polymorphisms (SNPs) in genes related to fiber growth. The study was carried out with 31 keratin genes (KRT9, KRT12, KRT13, KRT14, KRT16, KRT18, KRT20, KRT25, KRT1, KRT3, KRT5, KRT6a, KRT6b, KRT6c, KRT7, KRT8, KRT71, KRT80, KRT31, KRT32, KIRT40, KRT81, KRT82, KRT10, KRT15, KRT17, KRT19, KRT2, KRT4, KRT79 y KRT83) associated with wool, fiber and hair characteristics in sheep, goat and human, respectively. These gene sequences were retrieved from the National Center for Biotechnology Information (NCBI) database. Using databases and bioinformatics tools such as the Conserved Domains database, Spling and Megablast, unique sequences for each gene were identified. These sequences were compared to the reference genomes: *Vicugna_pacos-2.0.2* and *Vi_pacos_V1.0* to identify single nucleotide polymorphisms (SNPs). In this manner, 48 SNPs were identified and localized in both intronic and exonic regions of 22 genes. We did not identify SNPs for KRT10, KRT15, KRT17, KRT19, KRT2, KRT4, KRT6b, KRT6c and KRT79. Comparative analysis among the four species studied allow to identify that sequences for KRT81, KRT6b and KRT6c genes are not present in the alpaca reference genomes. Similarly, genes KRT31, KRT14, KRT81, KRT83, KRT6b and KRT6c are not present in the ovine reference genome and, genes KRT31, KRT13, KRT81, KRT83, KRT6b and KRT6c are not present in the goat reference genome.

Keywords: Single nucleotide polymorphisms; keratin; haplotype.

I. INTRODUCCIÓN

La alpaca es criada principalmente para la producción de fibra, siendo esta apreciada por su finura, suavidad y la gran gama de tonalidades de colores naturales que se obtienen de ella. Sin embargo, la mayor población de alpacas es de vellón blanco, seleccionada así, debido a que la fibra blanca facilita su tinción artificial. La industria textil considera que la fibra de alpaca es una fibra especial ya que los artículos que se confeccionan con ésta son clasificados como artículos de lujo (Wang *et al.*, 2003). Por otro lado, la carne de alpaca posee un importante valor nutritivo por su alto contenido de proteína que llega hasta el 22% y su bajo contenido de colesterol (0.2%) y grasa (4%) (Cristofanelli *et al.*, 2004).

La crianza y el aprovechamiento tanto de la fibra como de la carne llegaron a su auge durante el imperio incaico, época durante la cual las alpacas se encontraban distribuidas por todo el Perú incluso en la costa. Durante las últimas décadas del imperio incaico la introducción de especies foráneas, como ovinos y vacunos, hizo que los camélidos fueran desplazados a zonas inhóspitas (FAO, 2005).

El desplazamiento de los camélidos hizo que la calidad de la fibra fuera decreciendo trayendo como consecuencia el bajo precio por libra de fibra. Por lo cual, el ingreso de los criadores alto-andinos se vio afectado. De los Rios (2006) menciona que la producción anual de fibra fina representa el 22% y fibra semifina el 46% además resalta que cada vez la fibra es más gruesa, seca y quebradiza.

La piel y la fibra de la alpaca fue una de las características que hizo que sobreviviera a climas tan abruptos de los andes, gracias a que protege al cuerpo de los agentes térmicos, mecánicos y microbiológicos (Junqueira y Carneiro, 1988; Banks, 1993). Charry (1998)

menciona que una de los caracteres más importantes para un plan de mejora en la fibra es la estructura folicular de la piel.

Rogers (2004) menciona que el folículo piloso es una estructura muy conservada en los mamíferos. De la misma manera, Schweizer *et al.* (2006) indica que las secuencias de genes de queratina son conservadas en mamíferos. Por lo tanto, es de suponerse que el uso de las secuencias de genes ortólogos de ovinos, cabras y humanos facilitarían la identificación de secuencias similares en alpacas. así mismo, la comparación de estas secuencias entre alpacas permitirá la identificación de marcadores moleculares genéticos.

El uso de marcadores moleculares como los PNSs puede ayudar a identificar regiones genómicas asociadas a las características de la fibra que pueden usarse para seleccionar animales superiores con los cuales se pueda lograr un mejoramiento genético acelerado y continuo.

Los PNSs son variaciones de un solo nucleótido en una secuencia, generalmente se originan de errores de replicación del ADN durante la división celular de las células germinales (Thavamanikumar *et al.*, 2011). Según Ramensky *et al.* (2002) los PNSs son abundantes y están distribuidos a lo largo del genoma. Sin embargo, para ser usados como marcadores genéticos se requiere que uno de sus alelos esté presente en al menos el 1% de la población (Brookes, 1999). Además, Brookes (1999) señala que los PNSs se caracterizan por ser estables genéticamente y poseer una baja tasa de mutación.

Se han realizado estudios para la identificación de polimorfismos de nucleótido simple en alpacas. Así, Foppiano (2016) ubicó 27 PNSs en genes de proteínas asociadas a la queratina (*KRTAP1-2*, *KRTAP6-1*, *KRTAP9-2*, *KRTAP11-1* y *KRTAP13-1*). Por otro lado, Delgado de la Flor (2014) realizó la caracterización de marcadores PNSs en el gen de Trichialina para estudiar su posible asociación con el fenotipo Suri y Huacaya, reportando la ubicación de 2 PNSs que se encuentran en desequilibrio de ligamiento con el gen Trichialina, pero no encontró asociación de esos PNSs con el fenotipo Suri o con el Huacaya. Por otro lado, Guzmán (2011) reportó PNSs para el gen TLR4, sin embargo, no encontró asociación entre animales sanos y enfermos afectados por *Pasteurella multocida*. Diversos autores han reportado PNSs en la secuencia de genes relacionados a la expresión del color del vellón en

alpacas (Cransberg y Munyard, 2011; Chandramohan *et al.*, 2013; Guridi *et al.*, 2011; Chandramohan *et al.*, 2015) También Mamani *et al.* (2017) con el objetivo de desarrollar una micromatriz semi-densa de PNSs identificó 50,686 PNSs en alpacas a partir del genotipado de un panel de radiación celular híbrido alpaca/hámster con una micromatriz de alta densidad de bovino.

A fin de realizar estudios de asociación entre marcadores moleculares y funciones biológicas específicas, el presente trabajo tuvo el objetivo de identificar y predecir la ubicación de PNSs en genes candidatos relacionados al crecimiento y características de la fibra de alpacas. Los PNSs identificados podrían ser incluidos en una futura micromatriz de PNSs de alpaca.

El presente trabajo tuvo como objetivo general la identificación y predicción de polimorfismos de nucleótido simple en genes candidatos a las características de la fibra y como objetivos específicos:

- Predecir la secuencia de los genes relacionados al crecimiento de la fibra en alpacas en base a genes ortólogos en otras especies.
- Identificar y predecir la ubicación de Polimorfismos de Nucleótido simple (PNSs) en los genes candidatos a las características de la fibra en alpacas

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 La alpaca

Entre todos los camélidos sudamericanos, la alpaca, es la principal productora de fibra, gracias a la característica térmica, resistencia y gran variedad de colores (Chávez, 2008). El Perú es el principal productor de fibra a nivel mundial y el principal exportador (FAO, 2005).

La alpaca (*Vicugna pacos*) es un descendiente domesticado de la Vicuña, conclusión a la que se llegó gracias a pruebas de ADN mitocondrial (Stanley y Kadwell *et al.* 1994), por este motivo la alpaca fue clasificada taxonómicamente de la siguiente manera:

Clase	<i>Mamalia</i>
Orden:	<i>Artiodáctyla</i>
Suborden:	<i>Tylópoda</i>
Familia:	<i>Camelidae</i>
Tribu:	<i>Lamini</i>
Género:	<i>Vicugna</i>
Especie:	<i>Vicugna pacos</i>

(Stanley y Kadwell *et al.*, 1994).

En la población de alpacas existen dos razas, la Suri y la Huacaya. La alpaca Suri posee una fibra lustrosa y de gran longitud, mientras que la alpaca Huacaya posee un vellón más compacto, opaco y ondulado (Hoffman y Fowler, 1995 y FAO, 2005).

2.2 Población de alpacas

La población de alpacas a nivel nacional es estimada en 3'574,416 cabezas, siendo esta cifra un 50.2% mayor respecto al censo realizado el año de 1994. El Perú posee el 75% de toda la población mundial de alpacas (FAO, 2005). La mayor parte de la población está constituida por la raza Huacaya (80.4%) seguida de la Suri (12.2%) y finalmente el fenotipo del cruce entre Huacaya y Suri (7.3%). La región de Puno concentra cerca del 50% de la población nacional de alpacas seguido de Cusco, Arequipa, Huancavelica, Ayacucho y Apurímac (INEI, 2012).

2.3 Estructura de la piel de alpaca

Lacolla et.al. (2010) menciona que el grosor de la piel de alpaca es muy variable y oscila entre 0.7 mm y 3.5 mm. La estructura presenta 3 capas: epidermis, unión dermoepidérmica y la dermis (Torres de Jasauí *et al.* 2007).

a) Epidermis

Torres de Jasauí *et al.* (2007) mencionan que la epidermis posee un grosor de 60 μ m, formada por 4 estratos, diferenciados por la morfología de los queratinocitos. Siendo estas: el estrato basal, espinoso, granuloso y corneo.

b) Dermis

Formada por tejido conectivo con un grosor aproximado de 2,34 mm. Dividido en tres zonas: dermis capilar, reticular y profunda. En la dermis se encuentran el mayor número de capilares sanguíneos los cuales forman grupos alrededor de los grupos foliculares.

Calle (1982) menciona que la alpaca posee un reducido número de glándulas sebáceas, por lo cual, el rendimiento al lavado es mayor que en otras especies como los ovinos.

2.4 El folículo

En la piel se encuentran estructuras tubulares cuyo nombre es folículo piloso. Los folículos pilosos cubren casi en su totalidad la dermis y presentan un ensanchamiento en la base denominado bulbo piloso. El folículo piloso presenta una papila de tejido conectivo bastante

irrigado por los capilares. La papila invagina profundamente formando un área bastante notoria (Bustinza, 2001).

En la piel se encuentran grupos foliculares; compuesto por un folículo primario rodeado de 3 a 26 folículos secundarios en la alpaca huacaya siendo menor en las alpacas suri (Badajoz *et al.*, 2009).

a) Folículo primario

El folículo primario (FP) se desarrolla durante el estadio fetal, produce una fibra de mayor diámetro que el folículo secundario, además, está relacionado con las glándulas sebáceas, sudoríparas y el musculo erector (Badajoz *et al.*, 2009).

b) Folículo secundario

El desarrollo de los folículos secundarios (FS) se da luego de la formación de los folículos primarios, madurando después del nacimiento. Los FS desarrollan una fibra de menor diámetro y normalmente son acompañados de glándulas sudoríparas (Badajoz *et al.*, 2009).

2.5 Genes relacionados al desarrollo de la fibra en el folículo piloso

La información de los genes relacionados al desarrollo de la fibra en alpacas es bastante escasa. Por otro lado, se han desarrollado numerosos estudios, respecto a la formación de la fibra, en humanos, ratones, cabras y especialmente ovejas.

Los folículos son apéndices exclusivos de los mamíferos y su función es similar entre estos. La fibra está compuesta principalmente de proteínas de queratina (KTR) y genes de proteína asociadas a queratina (KAP). Los genes *KTR* y *KAP* se expresan de manera regulada durante el desarrollo del folículo piloso y crecimiento de la fibra (Yu *et al.*, 2011). Los filamentos intermedios de queratina (KIFs) y los KAPs, por su cantidad, se propone que son determinantes de las cualidades de la fibra (Rogers, 2006). Los filamentos intermedios (IF) están compuestos por los tipos I y II, donde tiene lugar la expresión de las queratinas. En ovinos están muy bien estudiados, se conocen hasta 17 genes de queratinas de los cuales 10 pertenecen al tipo I y 7 al tipo II (Tabla 1) (Yu *et al.*, 2011).

Tabla 1: Genes de queratina en los mamíferos

Lugar de expresión	Filamentos intermedios (IF)	
	Tipo I	Tipo II
Epitelio de la piel	<i>KRT9, KRT10, KRT12,</i>	<i>KRT1, KRT2, KRT3, KRT4,</i>
	<i>KRT13, KRT14, KRT15,</i>	<i>KRT5, KRT6a, KRT6b,</i>
Fibra	<i>KRT16, KRT17, KRT18,</i>	<i>KRT6c, KRT7, KRT8, KRT71,</i>
	<i>KRT19, KRT20, KRT23,</i>	<i>KRT72, KRT73, KRT74,</i>
	<i>KRT24, KRT25</i>	<i>KRT75, KRT76, KRT77,</i>
		<i>KRT78, KRT79, KRT 80</i>
	<i>KRT31, KRT32, KRT33a,</i>	<i>KRT81, KRT82, KRT83,</i>
	<i>KRT33b, KRT34, KRT35,</i>	<i>KRT84, KRT85, KRT86,</i>
	<i>KRT36, KRT37, KRT38,</i>	<i>KRT87</i>
	<i>KRT39, KRT40</i>	

FUENTE: Adaptado de Fernández (2015)

Respecto a los genes de proteínas asociadas a queratinas (KAP), se dividen en 3 grupos (tabla 2). Rogers (2004) menciona que las KAP se expresan en las células del folículo piloso (matriz proliferativa) dando forma a la fibra, también en la corteza y cutícula. Langbein y Schweizer (2005) indican que la expresión de los genes *KIFs* y *KAPs* se dan en distintas capas de la fibra. (Figura 1)

Tabla 2: Genes codificantes de las proteínas asociadas a queratinas en mamíferos.

Grupo	Familia
High sulphur proteins (HS)	<i>KRTAP1, KRTAP2, KRTAP3, KRTAP10, KRTAP11, KRTAP12, KRTAP13, KRTAP14, KRTAP15, KRTAP16, KRTAP23, KRTAP24, KRTAP25, KRTAP26, KRTAP27</i>
Ultra-high sulphur proteins (USH)	<i>KRTAP4, KRTAP5, KRTAP9, KRTAP17</i>
High glycine-tyrosine proteins (HGT)	<i>KRTAP6, KRTAP7, KRTAP8, KRTAP19, KRTAP20, KRTAP21, KRTAP</i>

FUENTE: Adaptado de Gong *et al.* (2012)

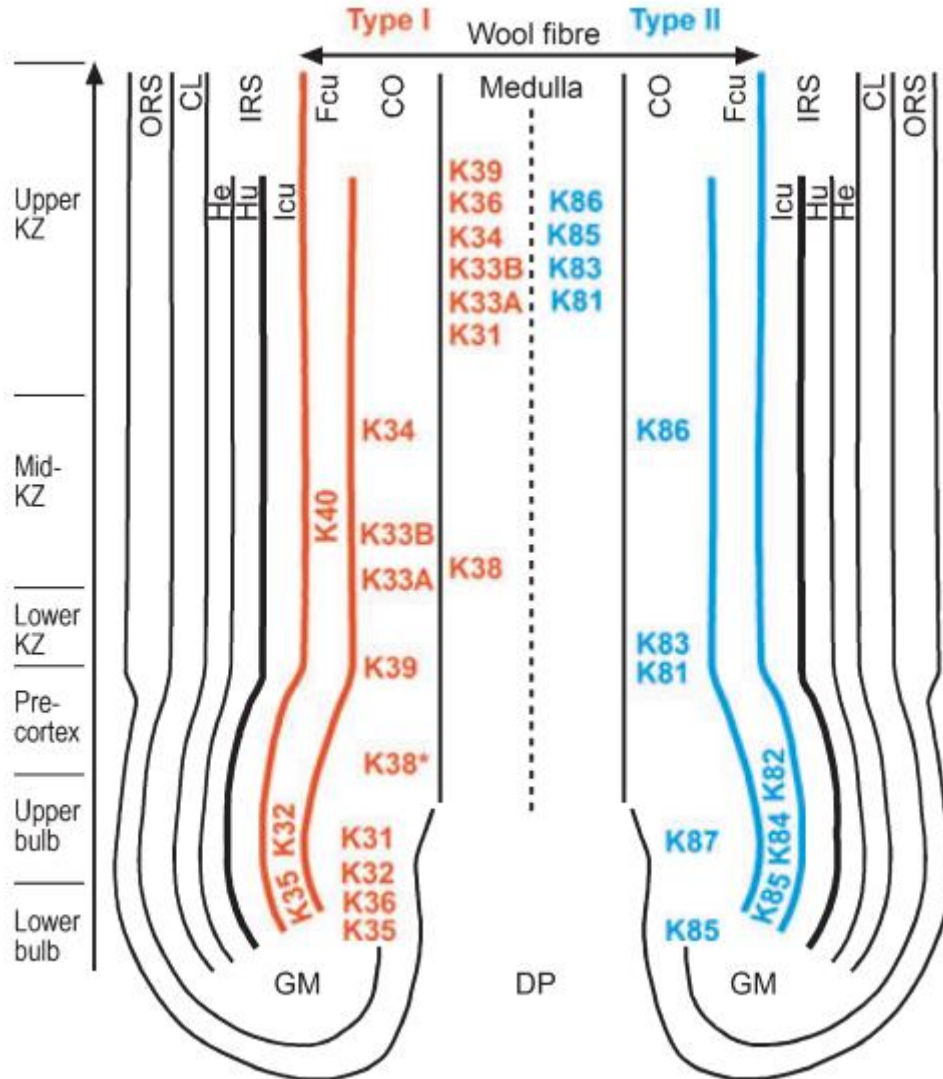


Figura 1. Diagrama de la expresión de las queratinas en el folículo de la lana de oveja. La posición de los nombres indica el lugar de inicio de su expresión. ORS, vaina radicular externa; CL, capa acompañante; IRS, vaina radicular interna; He, capa de Henle; Hu, capa de Huxley; Lcu, cutícula de la IRS; Fcu, cutícula de la fibra; CO, corteza; DP, papila dérmica; GM, matriz germinativa. (Yu *et al.*, 2011)

2.6 Polimorfismos de nucleótido simple

Los PNSs son variaciones en una secuencia de un solo nucleótido (figura 2), se generan por errores de replicación del ADN durante la división celular de células germinales (Thavamanikumar *et al.* 2011). Estos PNSs son abundantes en el genoma del individuo. sin embargo, no todos pueden ser considerados como tales, para que estos sean considerados marcadores genéticos deben estar presentes en al menos el 1% de la población (Brookes,

1999) además, señala que los Polimorfismos de nucleótido simple se caracterizan por ser estables genéticamente y poseer una baja tasa de mutaciones. La información obtenida de estos marcadores es bastante escasa, por ello, se necesita de una alta densidad de PNSs para tener un nivel adecuado de información.

Según Ramensky *et al.* (2002) los PNSs están distribuidos por todo el genoma, obteniendo un nombre diferente según la ubicación que tengan, regiones codificantes (cPNS), regiones intrónicas (iPNS), regiones reguladoras (rPNS) y regiones intergenómicas (gPNS).

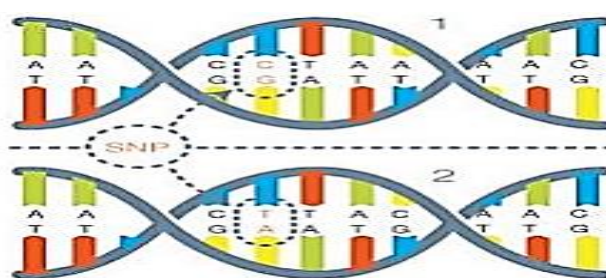


Figura 2. Polimorfismo de nucleótido simple

FUENTE: Tomado de Genetics Generation

2.7 Investigación de polimorfismos de nucleótido simple en alpacas

Los estudios realizados en alpacas empleando marcadores de polimorfismo de nucleótido simple son escasos, sin embargo, se logró identificar PNSs en genes ligados a la fibra por la importancia que esta tiene. Foppiano (2016) ubicó 32 PNSs en los genes *KRTAP1-2* (10), *KRTAP6-1* (9), *KRTAP9-2* (3), *KRTAP11-1* (6) y *KRTAP13-1* (4) de proteínas asociadas a la queratina y, además, identificó que el gen *KRTAP11-1* no ejerce ningún efecto en el diámetro de la fibra. Por otro lado, Delgado de la Flor (2014) realizó la caracterización de marcadores PNSs en el gen de Tricohialina y su posible relación con el fenotipo Suri y Huacaya, reportando la ubicación de 2 PNSs de gran importancia ya que se encuentran en desequilibrio de ligamento con el gen Tricohialina, componente importante de la fibra, sin embargo, no encontró relación con el fenotipo Suri o Huacaya.

Por otro lado, Guzmán (2011) reportó PNSs con genotipos GT y GC relacionados a genes que codifican los receptores tipo Toll (TLR) que son proteínas transmembrana, es posible que la TLR4 tenga una relación directa con cuadros de neumonía por *Pasteurella multocida* ya que reconoce la estructura de lipo-poli-sacáridos (LPS) estructura que poseen estos agentes patógenos. Rodríguez (2014) reportó moderada variabilidad en 8 PNSs en los genes *K33A*, *KAP1.1* y *KAP11.1*, sin embargo, no encontró asociación genética significativa entre la raza Huacaya y Suri. Recientemente Mamani (2017) reportó PNSs en alpacas a partir de un panel de celular híbrido de alpaca/hámster y una micromatriz de alta densidad de bovino, ubicando un total de 50,686 PNSs y concluyendo que es posible el uso de micromatrices de bovinos para el genotipado de alpacas.

III. MATERIALES Y METODOS

El trabajo realizado se llevó a cabo en dos fases: Fase de identificación de genes asociados al folículo piloso y fase de análisis bioinformático.

3.1 Identificación de genes de queratina

Se evaluaron 31 genes de queratina (Tabla 3) reportados para ovinos, cabras y humanos entre los cuales tenemos 12 genes del epitelio de tipo I (*KRT9*, *KRT10*, *KRT12*, *KRT13*, *KRT14*, *KRT15*, *KRT16*, *KRT17*, *KRT18*, *KRT19*, *KRT20* y *KRT25*), 13 genes del epitelio de tipo II (*KRT1*, *KRT2*, *KRT3*, *KRT4*, *KRT5*, *KRT6a*, *KRT6b*, *KRT6c*, *KRT7*, *KRT8*, *KRT71*, *KRT79* y *KRT80*), 3 genes de la fibra de tipo I (*KRT31*, *KRT32* y *KRT40*) y 3 genes de la fibra de tipo II (*KRT81*, *KRT82* y *KRT83*).

Tabla 3: Relación de genes queratina

Clasificación de los genes de queratina	Tipo I	Tipo II
Epitelio	<i>KRT9</i> , <i>KRT10</i> , <i>KRT12</i> , <i>KRT13</i> , <i>KRT14</i> , <i>KRT15</i> , <i>KRT16</i> , <i>KRT17</i> , <i>KRT18</i> , <i>KRT19</i> , <i>KRT20</i> , <i>KRT25</i>	<i>KRT1</i> , <i>KRT2</i> , <i>KRT3</i> , <i>KRT4</i> , <i>KRT5</i> , <i>KRT6a</i> , <i>KRT6b</i> , <i>KRT6c</i> , <i>KRT7</i> , <i>KRT8</i> , <i>KRT71</i> , <i>KRT79</i> , <i>KRT80</i>
Fibra	<i>KRT31</i> , <i>KRT32</i> , <i>KRT40</i>	<i>KRT81</i> , <i>KRT82</i> y <i>KRT83</i>

Las especies escogidas para predecir las secuencias de genes en alpacas fueron el ovino (*Ovis aries*) y la cabra (*Capra hircus*) como animales productores de fibra. Además, se decidió incluir al humano (*Homo sapiens sapiens*) debido a que los genes escogidos son conservados en mamíferos, y su genoma se encuentra ampliamente estudiado.

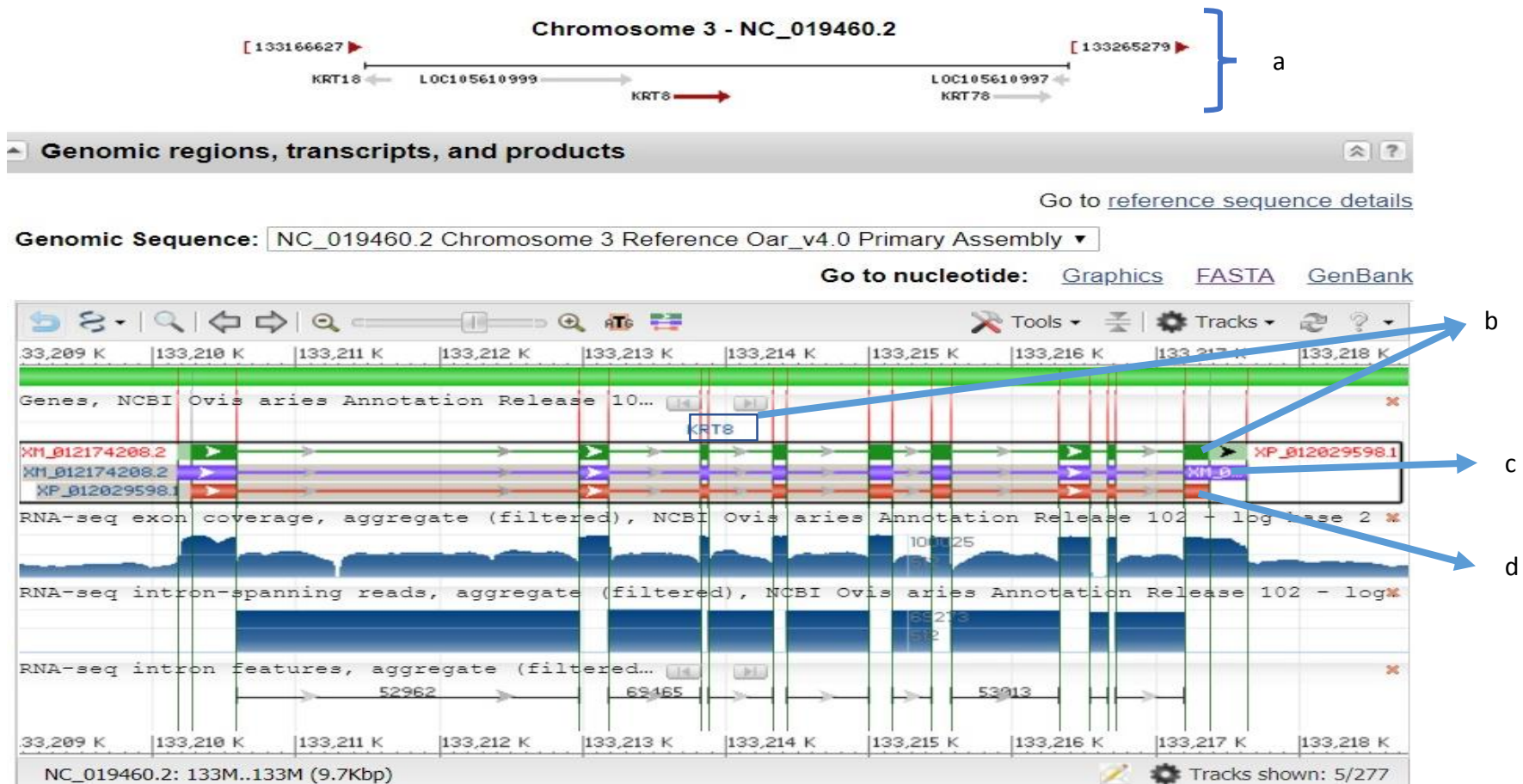
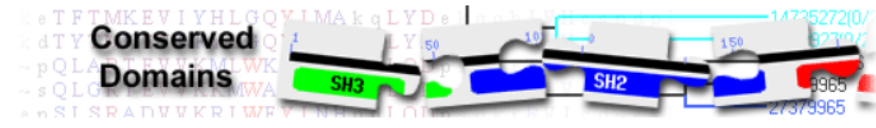


Figura 4. Región genómica, transcripciones y productos. a) Ubicación del gen *KRT8* en el cromosoma 3. b) Gen *KRT8*. c) RNAm del gen *KRT8*. d) Secuencia de aminoácidos del gen *KRT8*.

FUENTE: NCBI.

3.2.2 Descarte de secuencias compartidas con superfamilias

Las superfamilias son secuencias similares de proteína, que se asumen están relacionadas evolutivamente, pero que tienen distinta función. La herramienta Conserved Domain (figura 4) permitió la identificación de secuencias compartidas por superfamilias de genes con secuencias dentro de los genes de interés. De esta manera se identificaron en los genes interés exones e intrones que compartían secuencias similares con dichas superfamilias de genes. La utilización de dicho procedimiento fue delimitar y eliminar las secuencias de dichas regiones compartidas, ya que, si se halla un PNS en secuencias compartidas entonces probablemente se halle también en diferentes regiones del genoma.



Conserved domains on [gi|803043101|ref|XP_012029598.1|]

View Standard Results

PREDICTED: LOW QUALITY PROTEIN: keratin, type II cytoskeletal 8 [Ovis aries]

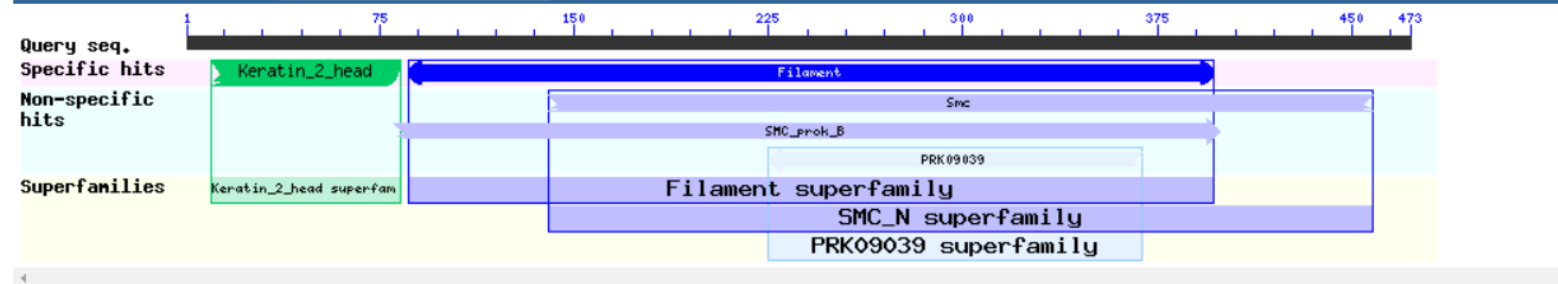
Protein Classification

Keratin_2_head and Filament domain-containing protein (domain architecture ID 12177255)

Keratin_2_head and Filament domain-containing protein

Graphical summary

Zoom to residue level show extra options



Search for similar domain architectures Refine search

List of domain hits

	Name	Accession	Description	Interval	E-value
[+]	Filament	pfam00038	Intermediate filament protein;	86-397	1.60e-152
[+]	Smc	COG1196	Chromosome segregation ATPase [Cell cycle control, cell division, chromosome partitioning];	140-458	1.21e-12
[+]	SMC_prok_B	TIGR02168	chromosome segregation protein SMC, common bacterial type; SMC (structural maintenance of ...	81-399	4.79e-10
[+]	PRK09039	PRK09039	hypothetical protein; Validated	225-369	2.10e-08
[+]	Keratin_2_head	pfam16208	Keratin type II head;	10-83	6.22e-08

Figura 5. Visualización de las superfamilias Filament (pfam0038), Smc (COG1196), SMC_prok_B (TIGR02168), PRK09039 (PRK09039) y Keratin_2_head (Pfam16208).

FUENTE: NCBI.

3.2.3 Identificación de regiones no traducidas, exones e intrones.

Una vez que se eliminaron los exones que eran compartidos con otros genes de la superfamilia, se procedió a utilizar el programa Splign (figura 5) que identifica en el ARNm las secuencias de acoplamiento entre exones o, mejor dicho, identifica el comienzo y el término de cada exón. Con este análisis se pudo disponer de la secuencia de cada exón y región no traducida (UTR) que contiene cada gen estudiado. De la misma manera y usando la secuencia genómica en formato FASTA donde se encuentra cada gen se obtuvo la secuencia de cada intrón.

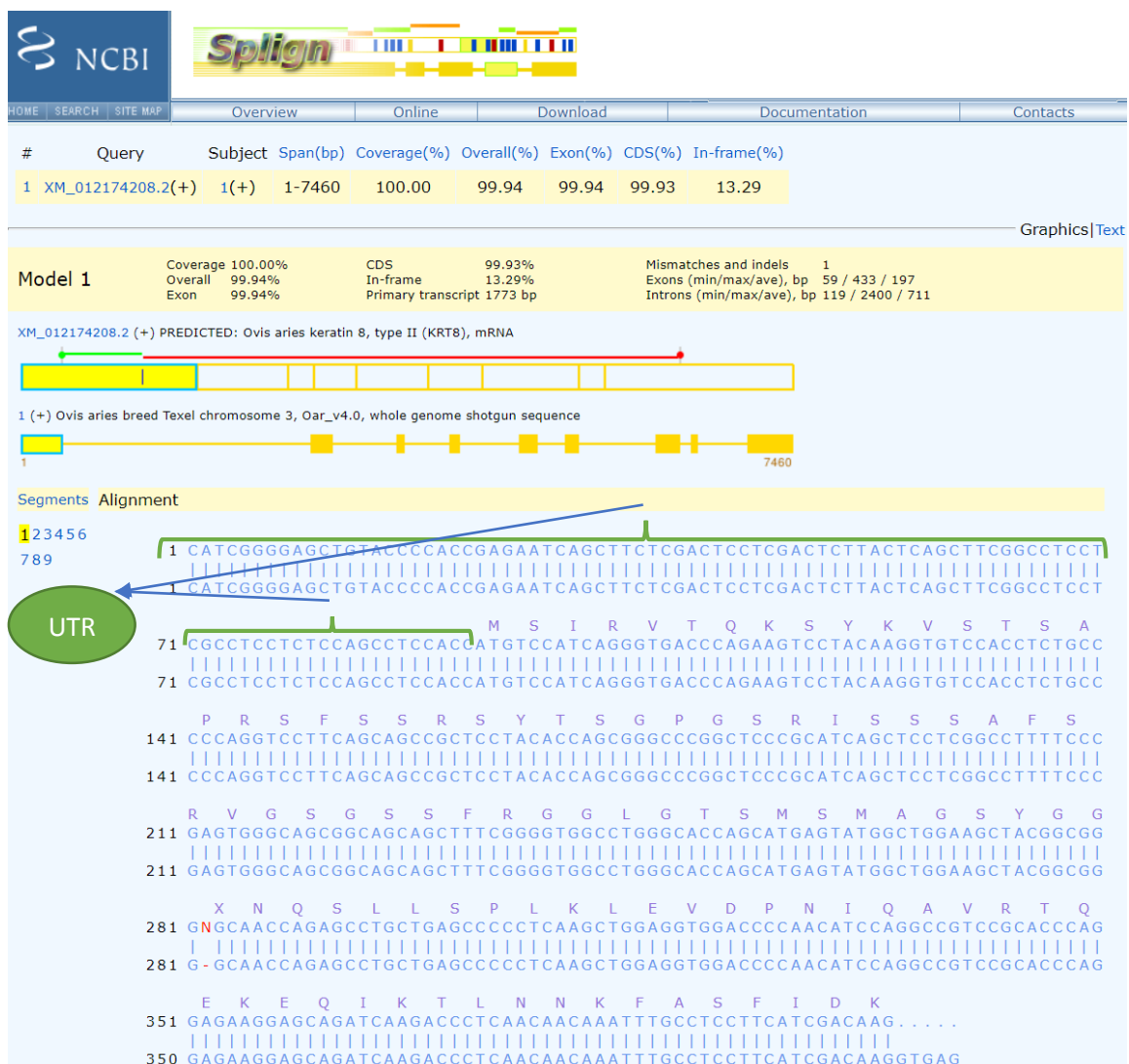


Figura 6. Visualización de la secuencia del exón 1 del gen *KRT8* de ovino.

FUENTE: NCBI.

3.2.4 Comparación de secuencias de interés.

La comparación de secuencia de nucleótidos se desarrolló con la herramienta MegaBlast (figura 6), con el objetivo de buscar e identificar similitudes y diferencias entre ellas. Este proceso fue usado con el fin de comparar e identificar regiones compartidas del mismo gen, entre animales de la misma y/o diferente especie.

Una vez que se descartó los exones compartidos con otros genes y se delimitaron los exones, intrones y UTR de los genes a trabajar en cada especie. Se siguió el siguiente procedimiento:

- Se comparó la secuencia de los exones e intrones de cada especie con la secuencia de la alpaca Carlotta (Vicpac 2.0.2) con el uso de Mega blast. Para identificar las zonas de similitud.
- Al obtener las secuencias similares se procedió a comparar dicha secuencia con el genoma de otra alpaca (Vi.pacos 1.0) disponible en el NCBI.

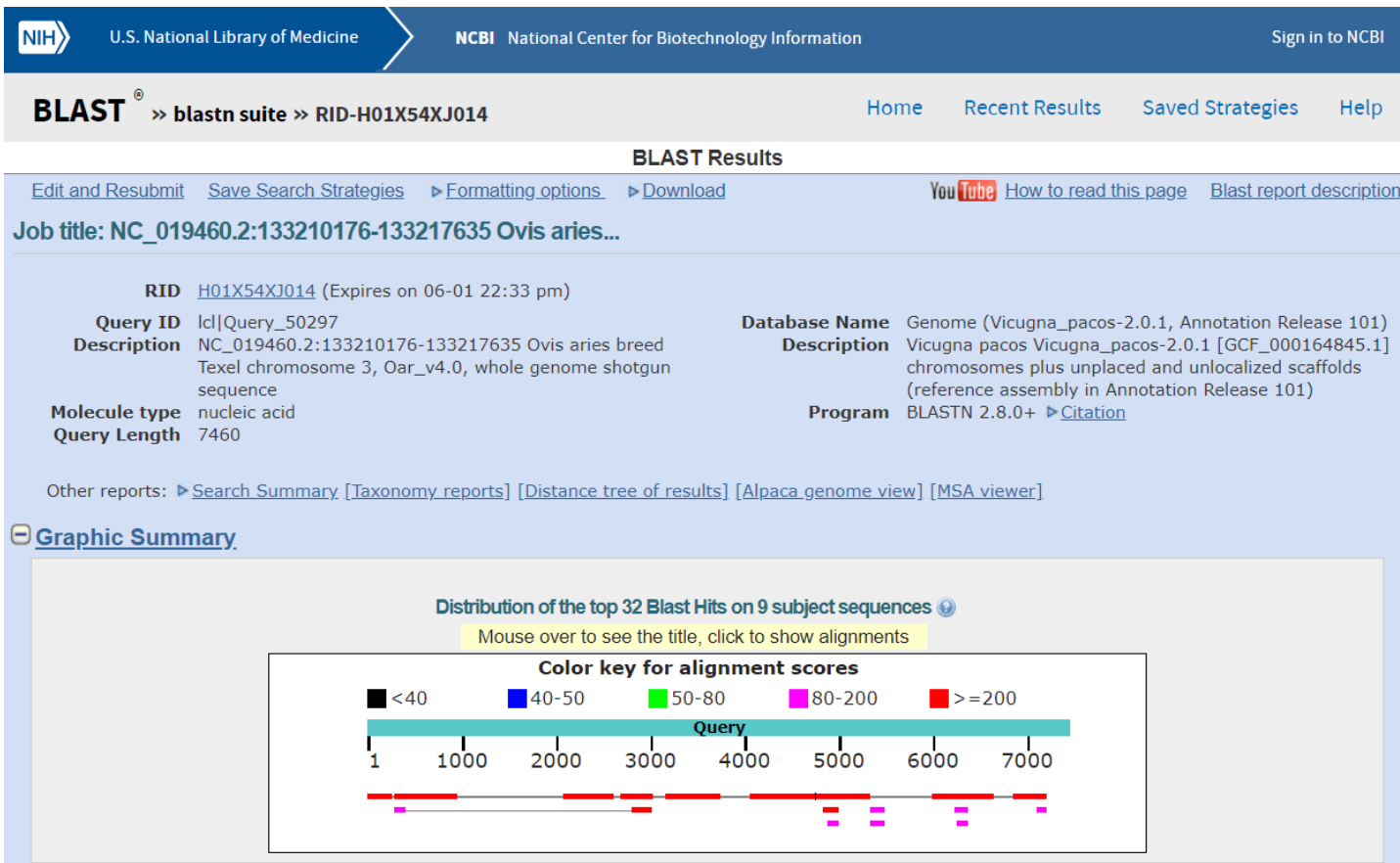


Figura 7. Comparación del genoma de la Alpaca con el gen *KRT8* de ovino. Las líneas rojas y rosadas que se pueden observar vienen a ser secuencias similares que comparten ambas especies.

FUENTE: NCBI.

3.2.5 Identificación de polimorfismos de nucleótido simple

Con los resultados de la última comparación entre Vicpac 2.0.2 y el Vi.pacos 1.0 se pudo obtener 2 secuencias bastante parecidas ya que era la comparación de dos genomas de la misma especie. Sin embargo, en algunos de los genes de interés se pudieron identificar diferencias en un solo nucleótido siendo estos los PNSs (figura 7).

Si bien se hallaron PNSs en la comparación de genes, no todos podían ser usados ya que se requiere que los PNSs estén bien distribuidos por el genoma pues dos de estos juntos interfieren en el análisis de genotipado. Así, tenían que cumplir con el requisito de no existir otro PNS en la secuencia de 50 nucleótidos flaqueando tanto en la hebra 5' como en la 3' (anexo 1).

Vicugna pacos huacaya unplaced genomic scaffold scaffold82, whole genome shotgun sequence
Sequence ID: [KN267589.1](#) Length: 8325403 Number of Matches: 1

Range 1: 6584428 to 6584745		GenBank	Graphics	▼ Next Match	▲ Previous Match
Score	Expect	Identities	Gaps	Strand	
577 bits(312)	1e-162	316/318(99%)	0/318(0%)	Plus/Minus	
Query 1	GTAAGGATAACTGGCTGGGTAGCTCTTGACTTTCGTCCTAAAGTATTTTGTGAAAATGGC				60
Sbjct 6584745	GTAAGGATAACTGGCTGGGTAGCTCTTGACTTTCGTCCTAAAAATTTTGTGAAAATGGC				6584686
Query 61	AAGCTAAGACTATGAACAGGATGTAACAGTAACCTTTTCTTAGGTTAGAGGCAAGTCAATT				120
Sbjct 6584685	AAGCTAAGACTATGAACAGGATGTAACAGTAACCTTTTCTTAGGTTAGAGGCAAGTCAATT				6584626
Query 121	TggcatttttagaaaattttaattttctcagaagCTGGTAATAGTTCAGTGGTTTTATTGC				180
Sbjct 6584625	TGGCATTTTTAGAAAATTTAATTTCTCAGAAGCTGGTAATAGTTCAGTGGTTTTATTGC				6584566
Query 181	TTAGAAGCAAGGGATGGCCAAGATGTCCTAGGTTAGTAATAGAAGGGCAATGACAGGCAA				240
Sbjct 6584565	TTAGAAGCAAGGGATGGCCAAGATGTCCTAGGTTAGTAATAGAAGGGCAATGACAGGCAA				6584506
Query 241	AGCCGATTTTAGTTCAGAAAGCTAGATTTAGGCCTCACCTCCTCTGAATCTCCTAATCA				300
Sbjct 6584505	AGCCGATTTTAGTTCAGAAAGCTAGATTTAGGCCTCACCTCCTCTGAATCTCCTAATCA				6584446
Query 301	CTTCTGATTTCTTGAGCAG 318				
Sbjct 6584445	CTTCTAATTTCTTGAGCAG 6584428				

Figura 8. Visualización de 2 polimorfismos de nucleótido simple (marca roja) en el intrón 2 del gen *KRT 1* de alpaca.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Genes de queratina

4.1.1 Queratinas del epitelio de tipo I

Se logró identificar y predecir la ubicación de 14 PNSs los cuales se encuentran distribuidos en los genes *KRT9*, *KRT12*, *KRT13*, *KRT14*, *KRT16*, *KRT18*, *KRT20* y *KRT25* (anexo 2). Sin embargo, en los genes *KRT10*, *KRT15*, *KRT17* y *KRT19* no se hallaron PNSs.

a. KRT9

En el gen *KRT9* de la alpaca se identificó 2 PNSs en el intrón 6, los cuales fueron ubicados en el Scaffold 450 y Scaffold 853 del genoma Vicpac 2.0.2 y el Vi.pacos 1.0, respectivamente.

b. KRT12

En el gen *KRT12* de la alpaca se identificaron 7 PNSs en el exón 7 e intrón 6, los cuales fueron ubicados en el Scaffold 188 y 79 del genoma de Vicpac 2.0.2 y el Vi.pacos 1.0, respectivamente. Sin embargo, 5 PNSs hallados en el intrón 6 fueron descartados por no estar separados por al menos 50 pares de bases.

c. KRT13

En el *KRT13* de la alpaca se identificaron 5 PNSs en el exón 1 e intrón 1, los cuales fueron ubicados en el Scaffold 450 y 853 del genoma Vicpac 2.0.2 y el Vi.pacos 1.0, respectivamente. Sin embargo, los 4 PNSs hallados en el intrón 1 fueron descartados por no estar separados por al menos 50 pares de bases.

d. *KRT14*

Se identificó de 8 PNSs en el gen *KRT14* de alpaca en la estructura del exón 1 e intrón 1 los cuales fueron ubicados en el Scaffold 450 y 853 del genoma Vicpac 2.0.2 y el Vi.pacos 1.0, respectivamente. Sin embargo, de los 8 PNSs ubicados 6 fueron descartados por no estar separados por al menos 50 pares de bases.

e. *KRT16*

En el gen *KRT16* de alpaca se identificaron 7 PNSs en el exón 1, exón 8 e intrón 1, los cuales fueron ubicados en el Scaffold 450 y 853 del genoma Vicpac 2.0.2 y el Vi.pacos 1.0, respectivamente. Sin embargo, se descartaron 4 PNSs por no estar separados por al menos 50 pares de bases.

f. *KRT18*

En el gen *KRT18* de alpaca se identificó un total de 11 PNSs en el scaffold 26 y 82 de genoma Vicpac 2.0.2 y el Vi.pacos 1.0 en el del exón 1 y 2 e intrón 1 y 2. Sin embargo, 9 de los PNSs fueron descartados por no estar separados por al menos 50 pares de bases. Por ello, se tuvo un neto de 2 PNSs.

g. *KRT20*

En el intrón 2 del gen *KRT20* de alpaca se identificó 1 PNS en el scaffold 188 y 79 del genoma Vicpac 2.0.2 y el Vi.pacos 1.0, respectivamente.

h. *KRT25*

En el gene *KRT25* de alpaca se identificó 1 PNS en el scaffold 188 y 79 del genoma Vicpac 2.0.2 y el Vi.pacos 1.0, respectivamente.

Tabla 4: Ubicación de los genes de queratina del epitelio de tipo 1 y número de polimorfismos de nucleótido simple ubicados.

Gen	Vicpac 2.0.2		Vi.pacos 1.0		Región	PNS seleccionados
	Scaffold	N° accesión	Scaffold	N° accesión		
<i>KRT9</i>	450	NW_0058 83152.1	853	KN2690 95.1	Intrón 6	2
<i>KRT12</i>	188	NW_005 882890.1	79	KN2703 53.1	Exón 7	1
					Intrón 6	1
<i>KRT13</i>	450	NW_005 883152.1	853	KN2690 95.1	Exón 1	1
					Intrón 1	0
<i>KRT14</i>	450	NW_0058 83152.1	853	KN2690 95.1	Exon1	0
					Intrón 1	2
<i>KRT16</i>	450	NW_005 883152.1	853	KN2690 95.1	Exón 1	0
					Exón 8	1
					Intrón 1	2
<i>KRT18</i>	36	NW_005 882738.1	82	KN2675 89.1	Exón 1	1
					Intrón 1	1
<i>KRT20</i>	188	NW_005 882890.1	79	KN2703 53.1	Intrón 2	1
<i>KRT25</i>	188	NW_005 882890.1	79	KN2675 89.1	Intrón 1	1

En el grupo de genes del epitelio de tipo 1 se predijeron la ubicación de un total de 14 PNSs distribuidos en 8 genes. La ubicación y secuencia de los PNSs se presentan en la tabla 5

Tabla 5: Secuencia y ubicación de los polimorfismos de nucleótido simple hallados en genes de queratina del epitelio de tipo 1

Gen	Polimorfismos de nucleótido siempre	Secuencia	Posición del nucleótido polimórfico	
			Vicpac 2.0.2	Vi.pacos 1.0
<i>KRT9</i>	UNALM_KRT9_I6_0000001	ATAGAGGCAGCTGGGAAAGCTCCTGTACACAAGG GTCTGATGGATTGCGG(A/G)TTTCTTCCTCCCATGG GGGGAACCTCAGGGCATTGGGGCTTTGGGAAAGG	165364	1059074
	UNALM_KRT9_I6_0000002	TAGGAGGACTCACATTACATTTGGGTCTTCTGTCC GGGTTCAATTCTTGTA(T/C)ATATATGTGAGGTTAC TCATTTCATATCTGTGTTTTCTTCTCAGTCAGTC	165149	1059291
<i>KRT12</i>	UNALM_KRT12_E7_0000003	TCATTCCAGAAAGCATCATGCAATATCCTCTCCTT TGTTTTCTTTACAGTG(A/T)CTTTGGATGAAAGTTC ATACGTGATGACAGCCTCCAAATCTCAAGCACCA	3304201	183235
	UNALM_KRT12_I6_0000004	GATAAAAGATCATAGAATGCTGAGCTGAACAACG GCACCACAGAGAGGCA(C/T)ACTGCGGCTCAGTAC TAGAAAAACCAACCGCTCCAGTTCTGGTATCAGTG	3304644	182812
<i>KRT13</i>	UNALM_KRT13_E1_0000005	GCATCCACTCTGGGCAAGAGCCACAGTCCTCGGA CAGCTCAGGCCA(G/A)GCTCCCCTGCACCTGTGC TCTCTCCATCTCACTCTCACCATGAGCTGTC	114067	1109551
<i>KRT14</i>	UNALM_KRT14_I1_0000006	CTCACACCACTGGCAACTTCAGATTCCCAGACAGG ACAGCCTCCAGCCCC(A/G)GACCCCTTCTTCTAGCT CTGAATGCCCCGAGTGGAGCCGATCCATGAGAA	181196	1043369
	UNALM_KRT14_I1_0000007	TCTGGGCCCCTGATCCTCAGACCATGAGAGACCA GGGATTCCCTACCCTTA(C/T)GTTGTACAGAGGAAG AAGTTGAGACTTTGGGCTGTCTGCCCAAGGTCACA	181061	1043504
<i>KRT16</i>	UNALM_KRT16_E8_0000008	CTCCCGAAGGCCTGCATCACGCCCTGCTCTCCA CCACGGCTCCAGCC(G/A)TCTTCCCTCCCTCTCCA CTGGGGGCAGGCTAATAAAGCTGACTGTCTGGT	199924	1025063

	UNALM_KRT16_I1_0000009	CACTTAGAATTGATGGCAGAAGGTCCCTTTTCAGC ATCAAGGCATCTGAG(T/C)GGGCCTGGTACCCTGA ATCTCTTATTCCCTGCAAGCATTCTTTGCACTCA	201980	1023007
	UNALM_KRT16_I1_0000010	AGCTTCTCTCAGCCTCGGGCCCAGGATGGGGTGGT GGAGATGTGGGGTGC(G/A)TCCTCTACACATGCTG AGCTGGGTGGAGAAGGCATCCCAGGCTGTTTGGG	201880	1023107
<i>KRT18</i>	UNALM_KRT18_E1_0000011	AGCTACGCGCCGCGACCAGTCAGCAGCGCGGCCA GCGTCTATGCAGGCGC(C/A)GGGGGCTCGGGATCG CGGATCTCCGTGTCCCGCTCCACCAGCTCCCGGGG	10882719	6755426
	UNALM_KRT18_I1_0000012	GGACAGGACTTCTTAGTAGCTGCTCACTTCCAGAC AGGCCAGCCAGCAGG(G/A)GCCTGGAAGGAGGGG CAGCTGGAGACTGGCAGCACGGGAATTTGGGGCT G	10883569	6756276
<i>KRT20</i>	UNALM_KRT20_I2_0000013	AGCTGTTCCCTCATAAATGCTTCTACACTAGGGCTT CCTCATCCTGAATTC(G/A)TATAACGCATTGGTACT AAAGAGTCCTTTGTGGTTTAGAAGGTAACGTTT	3319318	168201
<i>KRT25</i>	UNALM_KRT25_I1_0000014	ACGTTTATTTCTAAATGTTCTTTTCCTTTCTTCACT GAATTCGAAAAACA(T/C)TGATCACTTCTACTTGTG ATTTCTTCAAGGGAATTTCAATTTAGCATTGG	3221301	263799

4.1.2 Genes de queratina del epitelio de tipo II

Se logró identificar y predecir la ubicación de 23 PNSs en los genes *KRT1*, *KRT3*, *KRT5*, *KRT6a*, *KRT7*, *KRT8*, *KRT71* y *KRT80* (anexo 3). Cabe mencionar que en los genes *KRT2*, *KRT4*, *KRT6b*, *KRT6c* y *KRT79* no se logró predecir la ubicación de PNSs.

a. *KRT1*

En el gen *KRT1* de alpaca se identificó 3 PNSs con las características deseadas en el intrón 2 y exón 9 de alpaca. Dichos PNSs están ubicados en el Scaffold 36 y 82 del Vicpac 2.0.2 y el Vi.pacos 1.0, respectivamente.

b. *KRT3*

En el gen *KRT3* de alpaca se identificó 2 PNSs en el intrón 1 e intrón 5. los cuales cumplen con la característica de que no se encuentran un PNSs en al menos 50 pares de bases tanto al lado 5' y 3'. Están ubicados en el Scaffold 36 y 82 del Vicpac 2.0.2 y el Vi.pacos 1.0, respectivamente.

c. *KRT5*

En el gen *KRT5* de alpaca se identificó 5 PNS. Los cuales fueron ubicados en el Scaffold 36 y 82 de los dos genomas en estudio. 3 de los PNS fueron descartado por no estar separados por al menos 50 pares de bases.

d. *KRT6a*

En el gen *KRT6a* se identificó 2 PNS en el exón 1 y 9, los cuales fueron ubicados en el Scaffold 36 y 82 del Vicpac 2.0.2 y el Vi.pacos 1.0, respectivamente.

e. *KRT7*

En el gen *KRT7* de alpaca se identificó 6 PNSs, los cuales fueron ubicados en el intrón 2 y 6 en el scaffold 36 y 82 del genoma Vicpac 2.0.2 y el Vi.pacos 1.0. respectivamente. 4 PNS fueron descartados por no estar separados por al menos 50 pares de bases.

f. *KRT8*

En el gen *KRT8* de alpaca se identificó 1 PNS en el scaffold 36 y 82 del genoma Vicpac 2.0.2 y el Vi.pacos 1.0, respectivamente.

g. *KRT71*

En el gen *KRT71* se identificó de 8 PNSs. Sin embargo, se descartaron 3 PNS por no estar separados por al menos 50 pares de bases. Los cuales fueron localizados en el scaffold 36 del Vicpac 2.0.2 y el 82 del Vi.pacos 1.0, respectivamente.

h. *KRT80*

En el gen *KRT80* de alpaca se identificó PNS en el scaffold 36 y 82 del genoma Vicpac 2.0.2 y el Vi.pacos 1.0, respectivamente.

Tabla 6: Ubicación de los genes de queratina del epitelio de tipo II y número de polimorfismos de nucleótido simple ubicados.

Gen	Vicpac 2.0.2		Vi.pacos 1.0		Región	PNS seleccionados
	Scaffold	N° accesión	Scaffold	N° accesión		
<i>KRT1</i>	36	NW_005 882738.1	82	KN2675 89.1	Intrón 2	2
					Exón 9	1
<i>KRT3</i>	36	NW_005 882738.1	82	KN2675 89.1	Intrón 5	1
					Intrón 1	1
<i>KRT5</i>	36	NW_005 882738.1	82	KN2675 89.1	Intrón 7	2
<i>KRT6a</i>	36	NW_005 882738.1	82	KN2675 89.1	Exón 1	1
					Exón 9	1
<i>KRT7</i>	36	NW_005 882738.1	82	KN2675 89.1	Intrón 2	1
					Intrón 6	1
<i>KRT8</i>	36	NW_005 882738.1	82	KN2675 89.1	Intrón 1	1
<i>KRT71</i>	36	NW_005 882738.1	82	KN2675 89.1	Exón 9	1
					Intrón 1	2
					Intrón 8	2
<i>KRT80</i>	36	NW_005 882738.1	82	KN2675 89.1	Intrón 2	6

En el grupo de genes del epitelio de tipo 2 se predijo la ubicación de un total de 23 PNSs distribuidos en los 8 genes. La ubicación y secuencia de los PNSs se presentan en la tabla 7.

Tabla 7: Secuencia y ubicación de los polimorfismos de nucleótido simple hallados en genes de queratina del epitelio de tipo 2

Gen	polimorfismos de nucleótido simple	Secuencia	Posición del nucleótido polimórfico	
			Vicpac 2.0.2	Vi.pacos 1.0
<i>KRT1</i>	UNALM_KRT1_I2_0000015	CGGAACAAGTAAGGATAACTGGCTGGGTAGCTCTTGACTTTTCGTCCTAAA(A/G)TATTTTGTGAAAATGGCAAGCTAAGACTATGAACAGGATGTAACAGTAAC	10710296	6584703
	UNALM_KRT1_I2_0000016	AGAAAGCTAGATTTTCAGGCCTCACCTCCTCTGAATCTCCTAATCACTTCT(A/G)ATTTTCCTTGCAGGTATGAGGATGAGATCAATAAGCGGACAAATGCGGAGA	10710033	6584441
	UNALM_KRT1_E9_0000017	CCTTGCAGCTGTGAGCACCCAGCCACACCAGCGTCA GTGGAAGCAGTAGCC(A/G)TGGAGGCGGTGGTTATAGCTCTGGCGGGCGGCGGCTACAGCTACAGCT	10707413	6581820
<i>KRT3</i>	UNALM_KRT3_I5_0000018	TCATTTAAACAAGTGCTTGCTAAGCACCTCGAGGCAGGGTAGATGTTAGG(G/A)ACAGAGAAACAAGTCAGGCAAAGCTGCATTAACATCTCACCTCCTTCTA	10757446	6631593
	UNALM_KRT3_I1_0000019	TACTATTTTCAGTTTATTTTAAAGGTGTGTTTAGTAGCTTGAATAAACTT(A/G)TTGCCTTGAAGGCAAACCC AACCCTGACTACTTGAGATTAATTATCTCT	10761376	6635523
<i>KRT5</i>	UNALM_KRT5_I7_0000020	TTTGATAAAGTGCAGCTTCTCCTCCACTACAGGGTATAAAACACATGCAC(A/G)GGGGGCCACTATCTTGTGCATGATGGTTATGCATCATTAAATCCAATGATC	10579110	6457455
	UNALM_KRT5_I7_0000021	CATGCTTTCCTATAATGGGTGGAGGAGAGTGAGATGATAATTTTCTTC(T/C)GATAACCTGTTTCTAGGTCAAGTCCTCTTCCTTGGGACGTCTCTCCAGAG	10578638	6456983
<i>KRT6a</i>	UNALM_KRT6a_E1_0000022	TGGGGTCTGCCGCTCTGGCTTCAGCAGCATCTCGGTGTCCCGCTCCAGGG(A/G)CAGTGGTGGCCTGGCTGGAGTGTGTGGAGGAGCTGGCTTTGGCAGC	10539642	6419498

	UNALM_KRT6a_E9_0000023	GCCTTAGGAAGTGGCCTCAGCTCCACCGGGGGCAG CAGTTTCACCATTA(A/G)TACTACTGCCACCTCCTCC TCCAGCAGGAAGAGCTACAAGCA	10536432	6416289
<i>KRT7</i>	UNALM_KRT7_I2_0000024	AGGCTGAGCTCCAGGCTCAGGCTGAAGGAGGACCT GGAAGGGGATGCAGG(A/G)AAGGGTCCTGAGTGCA GCTACTGGGGAGCTCCTCTCTGCACACCTCTGGG	10341890	6224591
	UNALM_KRT7_I6_0000025	CCACTGGAATATTCAAAATGCCTTAAGAGCAGGGA CCCTGTCTCTGTCTG(G/A)TTCCTACTGCTCCTCCCTGC CCAGCACCTCACTCATGGTCAGGGCACAGGTT	10347856	6230555
<i>KRT8</i>	UNALM_KRT8_I1_0000026	CTGGCTCGGAGAAGGGAAGCAACTCAAATTATGC AGCTCAGGTCAGTAG(C/T)AGTGTGGCTAAATCC TAGGTCTTCTGGCCAAGGCTCTCCAGGATGTAG	10849155	6721914
<i>KRT71</i>	UNALM_KRT71_E9_0000027	GTGTTCAGGAAAAGAGGGCTGGAGGGTAAATGAC CAGGCGAGGCCATCC(A/C)CACCCACCCTGGCTGT CTCGCGGCTCATTCTGAGTGGACCAAGTGCAAC	10608649	6486672
	UNALM_KRT71_I1_0000028	CTAGTGAGTTTCTGGCCCAGTGAGGCCACATAGC ATGGGGAGGTCTGTC(T/C)GTCCATCTTGCTCCGTGT GATATGCTTGCTCTAGGGAAGATGGTTCTGAG	10614973	6492995
	UNALM_KRT71_I1_0000029	TTCACCCACCTCAGGTGGTTGTTGTGAGGGGTAAA GGAGAAGACATGGGG(T/A)GAGCTATTTGTCCAGCC CCCAGGGAGTGACAGGTGTGACTGTTCCGTGG	10614493	6492515
	UNALM_KRT71_I8_0000030	ACCTAAAACCTGTAGAATCTGTGGACCGTAGAGGGC CTTAGTTACACCTTG(C/T)GTGTGTAGATGAGCAAT CTAAGGACCAGAGAGGGAAAACTTTGCCTGAG	10610044	6488067
	UNALM_KRT71_I8_0000031	GGCTAAGAATTCAATCAGAGCTTCTGAAAGATGCC ATCTGTAGAACGGCT(G/A)GCAGGACGGAGAGGTC GGAGGGTGGGAAGTTTAGGAAAAGAAAGGCTAAT	10609658	6487681
<i>KRT80</i>	UNALM_KRT80_I2_0000032	ACACACACACACGGTCCAGGATAGGTTA(C/T)GGAG ACACTTTCCAGGAGCCAATGGCCATGGGCTGCTC AGGGCCTCATC	10286153	6170154

UNALM_KRT80_I2_0000033	GCAGCCTCCCAGGCAACCCCCTGCCCCTCACCTCCA GGGACACAGGCTGG(A/C)GAGAGAGCCAGGGGTT GCCGAGGTCCTCCAGCTCCCAAGTGTATCTGGG	10286104	6170045
UNALM_KRT80_I2_0000034	ATCCTGGCTCAGTGATTATATGAACTTGAGGTTTCCT TCATCCCCTTATGC(C/T)TCAATGCGGAGAATAGGA CACCTAGCTCACTGGCCTGTTGTGAGGATTTAT	10285557	6169558
UNALM_KRT80_I2_0000035	CAAATGCTACCTAAGGCCTGGGCTAGAAGCACCCC TAGAGAGCCTTGTCT(G/A)GAACACCCCATGCCAC CCACCCCAACAACATGGTGACCAAGGAAGCCCC	10284818	6168819
UNALM_KRT80_I2_0000036	GATCTCTGTTAAGTTCACTTGAAGATCAACAAAAC CCTTCATCAGGAGA(A/G)CCCCAAAGGGCAGCTGG CCATGGAGCTCAGAGCCCTGCTGGCTCCAGGG	10284845	6168546
UNALM_KRT80_I2_0000037	CTTCCTTTTCCAGGGGCGATGCTTACAGCCTGGATG CTAGTGGGCAGGAC(C/T)GGGCAGCAAGCAGGGGC TAGGGGTGGCCTTCCTCAGCAGGCCTCGCAGCT	10284415	6168416

4.1.3 Queratinas de la fibra de tipo I

Se logró identificar y predecir la ubicación de 4 PNSs en los genes *KRT31*, *KRT32* y *KRT40* (anexo 4).

a. *KRT31*

En el gen *KRT31* de alpaca se identificó 2 PNS en el scaffold 450 y 853 del genoma Vicpac 2.0.2 y el Vi.pacos 1.0 respectivamente.

b. *KRT32*

En el gen *KRT32* de alpaca se identificó 1 PNS en el scaffold 450 y 853 del genoma Vicpac 2.0.2 y el Vi.pacos 1.0 respectivamente.

c. *KRT40*

En el gen *KRT40* de alpaca se identificó 1 PNS en el scaffold 188 y 79 del genoma Vicpac 2.0.2 y el Vi.pacos 1.0 respectivamente.

Tabla 8: Ubicación de los genes de queratina de la fibra de tipo 1 y número neto de polimorfismos de nucleótido simple ubicados.

Gen	Vicpac 2.0.2		Vi.pacos 1.0		Región	PNS seleccionados
	Scaffold	N° accesión	Scaffold	N° accesión		
<i>KRT31</i>	450	NW_005	853	KN2690	Exón 1	1
		883152.1		95.1	Intrón 6	1
<i>KRT32</i>	188	NW_005	79	KN2690	Intrón 5	1
		883152.1		95.1		
<i>KIRT40</i>	188	NW_005	79	KN2703	Intrón 5	1
		882890.1		53.1		

En el grupo de genes de queratina de la fibra de tipo 1 se predijo la ubicación de un total de 4 PNSs distribuidos en los 3 genes. La ubicación y secuencia de los PNSs estará disponible en la tabla 9.

Tabla 9. Secuencia y ubicación de los polimorfismos de nucleótido simple hallados en genes de queratina de la fibra de tipo 1

Gen	polimorfismos de nucleótido simple	Secuencia	Posición del nucleótido polimórfico	
			Vicpac 2.0.2	Vi.pacos 1.0
<i>KRT31</i>	UNALM_KRT31_E1_0000038	CCCAGCTGTCACGGCTGCACCCTGCCCGGGGCCTG CAACATCCCCGCCAA(C/T)GTGAGCAGCTGCAACT GGTTCTGCGAGGGCTCCTTCAATGG	15383	1189494
	UNALM_KRT31_I6_0000039	ACATTTTATAATACCGTGTTGTGTAGAGGGTATAT TTGCACATGCTACCT(T/C)ATCTGGTCTTGCAATTA CCACCAGGTAGGTAGGATCAGTATTCTCCT	50377	1172398
<i>KRT32</i>	UNALM_KRT32_I5_0000040	CCAGCTGTCACGGCTGCACCCTGCCCGGGGCCTGC AACATCCCCGCCAA(T/C)GTGAGCAGCTGCAACTG GTTCTGCGAGGGCTCCTTCAAT	67473	1189494
<i>KRT40</i>	UNALM_KRT40_I5_0000041	CATCATATCTAAAACAAAGATATTCAAACCTCTGCG TTCTACAACCTATCTC(T/C)AGCTTTTCCAGGATCCA CACCTCAACCGGATCCTTCACTACACCATACTC	3401161	86190

4.1.4 Queratinas de la fibra de tipo II

Con el presente se logró identificar y predecir la ubicación de 7 PNSs en los genes *KRT81*, *KRT82* y *KRT83* (anexo 5).

a. *KRT81*

En el gen *KRT81* de alpaca se identificó 2 PNS en el scaffold 36 y 82 del genoma Vicpac 2.0.2 y el Vi.pacos 1.0 respectivamente.

b. *KRT82*

En el gen *KRT82* de alpaca se identificó 1 PNS en el scaffold 36 y 82 del genoma Vicpac 2.0.2 y el Vi.pacos 1.0 respectivamente.

c. *KRT83*

En el gen *KRT83* de alpaca se identificó 4 PNS en el scaffold 36 y 82 del genoma Vicpac 2.0.2 y el Vi.pacos 1.0, respectivamente.

Tabla 10: Ubicación de los genes de queratina de la fibra de tipo 2 y número neto de polimorfismos de nucleótido simple ubicados.

Gen	Vicpac 2.0.2		Vi.pacos 1.0		Región	PNS seleccionados
	Scaffold	N° accesión	Scaffold	N° accesión		
<i>KRT81</i>	36	NW_005882738.1	82	KN267589.1	Exón 9	1
					Intrón 6	1
<i>KRT82</i>	36	NW_005882738.1	82	KN267589.1	Intrón 5	1
<i>KRT83</i>	36	NW_005882738.1	82	KN267589.1	Intrón 1	4

En el grupo de genes de queratina de la fibra de tipo 2 se identificó y predijo la ubicación de un total de 7 PNSs distribuidos en los 3 genes. La ubicación y secuencia de los PNSs se encuentran en la tabla 11.

Tabla 11: Secuencia y ubicación exacta de los polimorfismos de nucleótido simple hallados en genes de la fibra de tipo 2

Gen	polimorfismos de nucleótido simple	Secuencia	Posición del nucleótido polimórfico	
			Vicpac 2.0.2	Vi.pacos 1.0
<i>KRT81</i>	UNALM_KRT81_E9_0000042	GCCTGTGCGCGCCCTGCGGCCAGCTCAACACCACCTGTGGA GGGGGTTCC(A/T)GCAGCCTGGGGAGGTGTTAGGCAGCCCC CAGGGAGAGCCAGAGAGGCCCC	10411693	6293279
	UNALM_KRT81_I6_0000043	GAGTCCTTGGTTGTGGTTACTCAGGGAGACCCAGGTGATGA AGGGGAGAG(G/A)CCCTGTTCCTGGGGTGATCCCAGCTGGC TGGGAGAGACTGGATACATATA	10413467	6295053
<i>KRT82</i>	UNALM_KRT82_I5_0000044	GAAATAGATTGCCTGTGGATGACACCAGGGTTCTATGCTAC CATCGGAA(T/A)ACAGGCTCCTTCTAGCTTTCATTCTGCCA TTCTTAATGCATTGCTTTAA	10486832	6368593
<i>KRT83</i>	UNALM_KRT83_I1_0000045	TTCATTGACAAGGTAGGTGTCCTTGATCTCACCTTTCCTGA ACTCCATTC(G/A)TGCTCAGAACTCAGTCTGGGCACTGAGG CAGAAGTCAGAGAAAGGCCCAT	10417746	6299330
	UNALM_KRT83_I1_0000046	CCATGTACAGTGGTTTGAGGGGCCAGGGGAGAAGGATTCAT TGCAGAAGC(A/C)GTCCTGGGACGAAGGGGGACTCTCCTGA ACCAACCTTGAGAGAAGTCATC	10417097	6298683
	UNALM_KRT83_I1_0000047	GAAAATCAAATTTGAGTTCTGCCATCGTGAGATCTCAGGCA GTCAGGGAA(C/T)CTCCCCAGGCCTTCGATTCTTCATCTGTA AAATGAGGGGTTTGGAAACACA	10416768	6298354
	UNALM_KRT83_I1_0000048	AAATCCTCATAGCGAGGCGGGCACTCTGCACAGGGGCTA AGTGCTATGCT(C/T)GAGGACACATTATTAACAAGCGGCAG CAGAGTCTGGCCTCAGCACGGCTT	10416468	6298054

4.2 Desarrollo de haplotipos

En el presente estudio se pudo identificar posibles haplotipos de PNSs. Los genes estudiados en los que se han identificado PNSs se encuentran en los scaffold 450, 188 o 36 del Vicpac 2.0.2. y la distancia entre ellos dentro de cada scaffold varían entre dieciséis mil a cien mil pares de bases. Por ello, fueron agrupados según al Scaffold que pertenecían

a. Scaffold 450

Los posibles PNS de los genes *KRT31*, *KRT32*, *KRT13*, *KRT9*, *KRT14* y *KRT16* formaron dos haplotipos, el 5'CTGAAG3' y el 5'TCAGGA3' (figura 8).

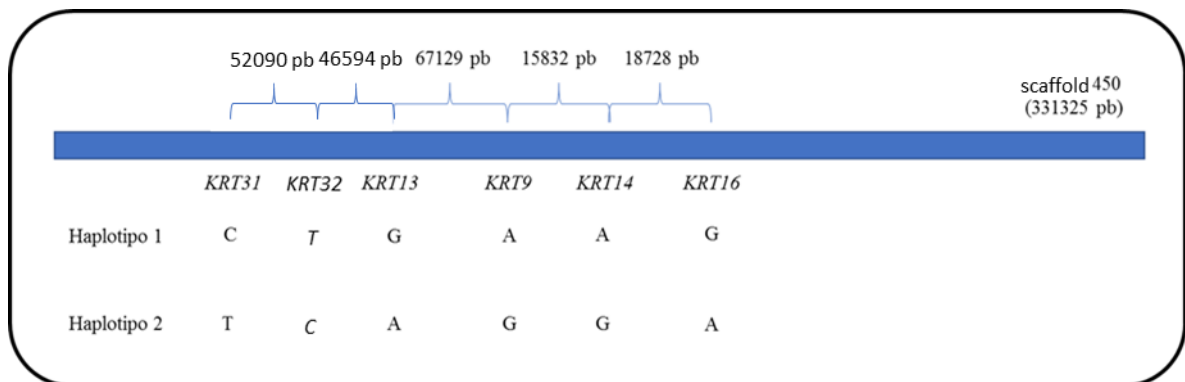


Figura 9. Ubicación de los genes de queratina en el Scaffold 450 y los haplotipos obtenidos.

b. Scaffold 188

Los posibles PNS de los genes *KRT25*, *KRT12*, *KRT20* y *KRT40* formaron dos haplotipos, 5'TAGT3' y el 5'CTAC3' (figura 9)

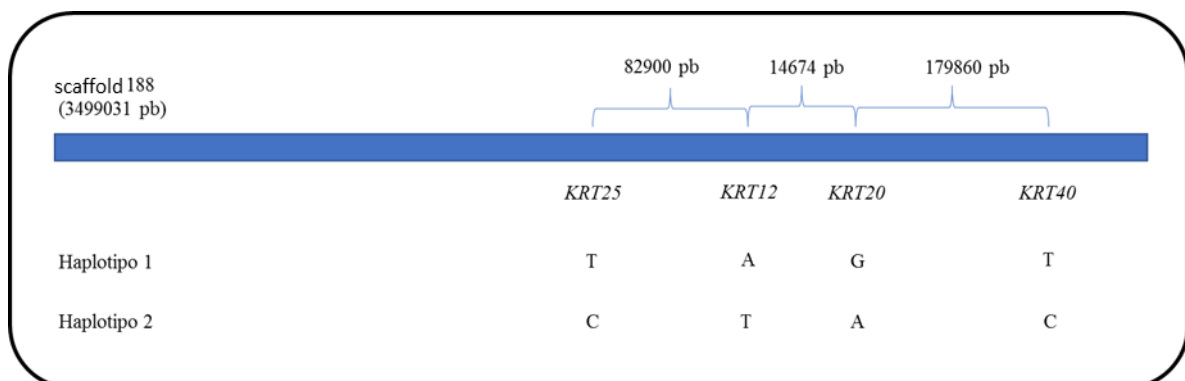


Figura 10. Ubicación de los genes de queratina en el Scaffold 188 y los haplotipos obtenidos.

c. Scaffold 36

Los posibles PNSs de los genes *KRT80*, *KRT7*, *KRT6a*, *KRT5*, *KRT71*, *KRT1*, *KRT3*, *KRT8*, *KRT18*, *KRT81*, *KRT83* y *KRT82* formaron dos haplotipos, 5´CAAAGAGCCACT3´ y 5´TGGGAGATATTA3´ (figura 10).

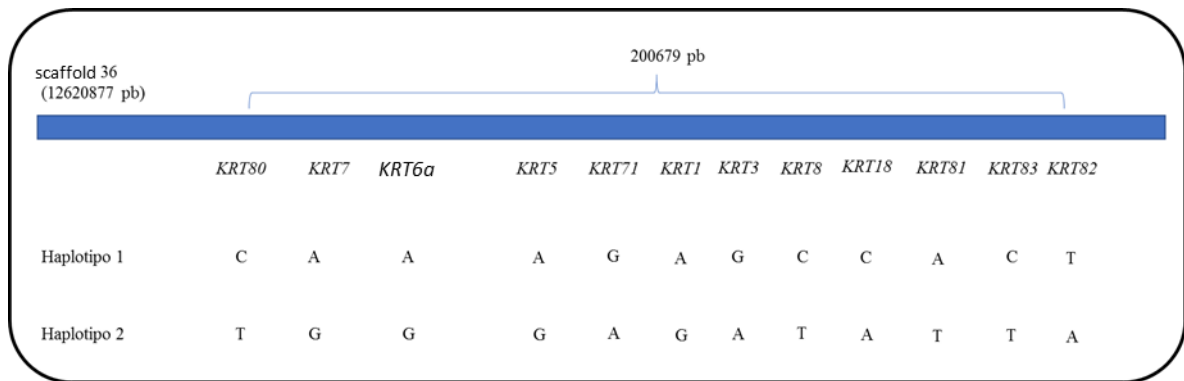


Figura 11. Ubicación de los genes de queratina en el Scaffold 36 y los haplotipos obtenidos.

4.3 Discusión

Pariset *et al.* (2006) identificaron un PNS en el exón 6 del gen *KRT1* en ovinos. En el presente trabajo se identificaron en alpaca 3 PNSs en el gen *KRT1*, 2 en el intrón 2 y 1 en el exón 9. En ovinos Sulayman *et al.* (2018) identificaron PNSs en los genes *KRT27*, *KRT31*, *KRT36*, *KRT38*, *KRT81* y *KRT85* y encontraron que el gen *KRT31* está significativamente asociado al diámetro de lana, por ello, sería importante utilizar los dos PNSs reportados en este estudio para el gen *KRT31* de la alpaca, porque también podrían estar asociados con el diámetro de fibra.

Schweizer *et al.* (2006) indican que las secuencias de los genes de queratina son conservadas en los mamíferos. Pero no todos los genes están presentes en las cuatro especies estudiadas. Los 31 genes de queratina utilizados para este trabajo fueron ubicados en su totalidad en humanos, los genes *KRT6b*, *KRT6c*, *KRT31*, *KRT81* y *KRT83* no están presentes y/o anotados para ovino y cabra en sus genomas referenciales en el NCBI y los genes *KRT6a*, *KRT6b*, *KRT6c* y *KRT81* no están presentes y/o anotados en el Vicpac 2.0.2. Sin embargo, en el presente trabajo fueron ubicadas dos secuencias similares a los genes *KRT6a* y *KRT81* en alpaca que aún no están anotadas en el VicPac 2.0.2. El gen *KRT6a* está ubicado entre el nucleótido 10536432 y el 10539642 del scaffold 36 y el gen *KRT81* está ubicado entre el

nucleótido 10411693 y el 10419541 del scaffold 36, por ello podemos concluir que estos genes existen en alpaca.

Hesse *et al.* (2004) desarrollaron un análisis de cluster de genes de queratina en humanos y ratas identificando clusters de queratinas de tipo I en el cromosoma 17 y 10 respectivamente, con un total de 27 genes y 4 pseudogenes en humanos. También ubicaron un cluster de queratinas de tipo II en el cromosoma 12 y otro en el cromosoma 7 de humanos y ratas respectivamente, con un total de 26 genes y 5 pseudogenes en humanos. En el presente trabajo se identificó la distribución de 12 genes de queratinas en el scaffold 36, de 4 genes en el scaffold 188 y 6 genes en el scaffold 450. Mendoza (2018) ubicó mediante hibridación fluorescente in situ (FISH) que el gen *KRT15* está ubicado en el cromosoma 16 q12-q13 en alpaca al igual que el scaffold 450, en consecuencia, los PNSs y genes ubicados en este scaffold se encuentran en el cromosoma 16 de alpaca (Figura 11). Además, cabe la posibilidad de que el número de genes dentro de cada scaffold sea mayor a lo reportado en el presente estudio, debido a que solo se consideraron 31 genes de queratina en este análisis.

Desde que los PNSs predichos conforman haplotipos de PNSs, estos serán segregados conjuntamente, dada que la posibilidad de que exista una recombinación haplotípica es baja, la probabilidad de que dos individuos no emparentados posean el mismo haplotipo también es baja. Por lo cual el uso de estos haplotipos para estudios de asociación a características fenotípicas de la fibra es recomendable. En especial el haplotipo encontrado en el scaffold 450 que incluye el gen *KRT31* relacionado con finura de lana (Sulayman *et al.*, 2018), en alpaca podría ser suficiente para identificar asociación entre estos genes y caracteres de la fibra desde que se analice una muestra adecuada de animales, facilitando de esta manera la implementación de selección asistida por marcadores moleculares.

De los 31 genes, en 9 genes (*KRT10*, *KRT15*, *KRT17*, *KRT19*, *KRT2*, *KRT4*, *KRT6b*, *KRT6c* y *KRT79*) no se pudo identificar ningún PNS exónico o intrónico. El gen *KRT10* se encuentra en el scaffold 188 alineado en tandem con los genes *KRT25*, *KRT12*, *KRT20* y *KRT40* (figura 11). Los genes *KRT15*, *KRT19* y *KRT17* se encuentran en el scaffold 450 alineados en tandem con los genes *KRT31*, *KRT32*, *KRT13*, *KRT9*, *KRT14* y *KRT16* (figura 11). Los genes *KRT2*, *KRT4* y *KRT79* se encuentran en el scaffold 36 y están alineados en tandem con los

genes *KRT80*, *KRT7*, *KRT81*, *KRT83*, *KRT82*, *KRT6a*, *KRT5*, *KRT71*, *KRT1*, *KRT3*, *KRT8* y *KRT18* (Figura 12).

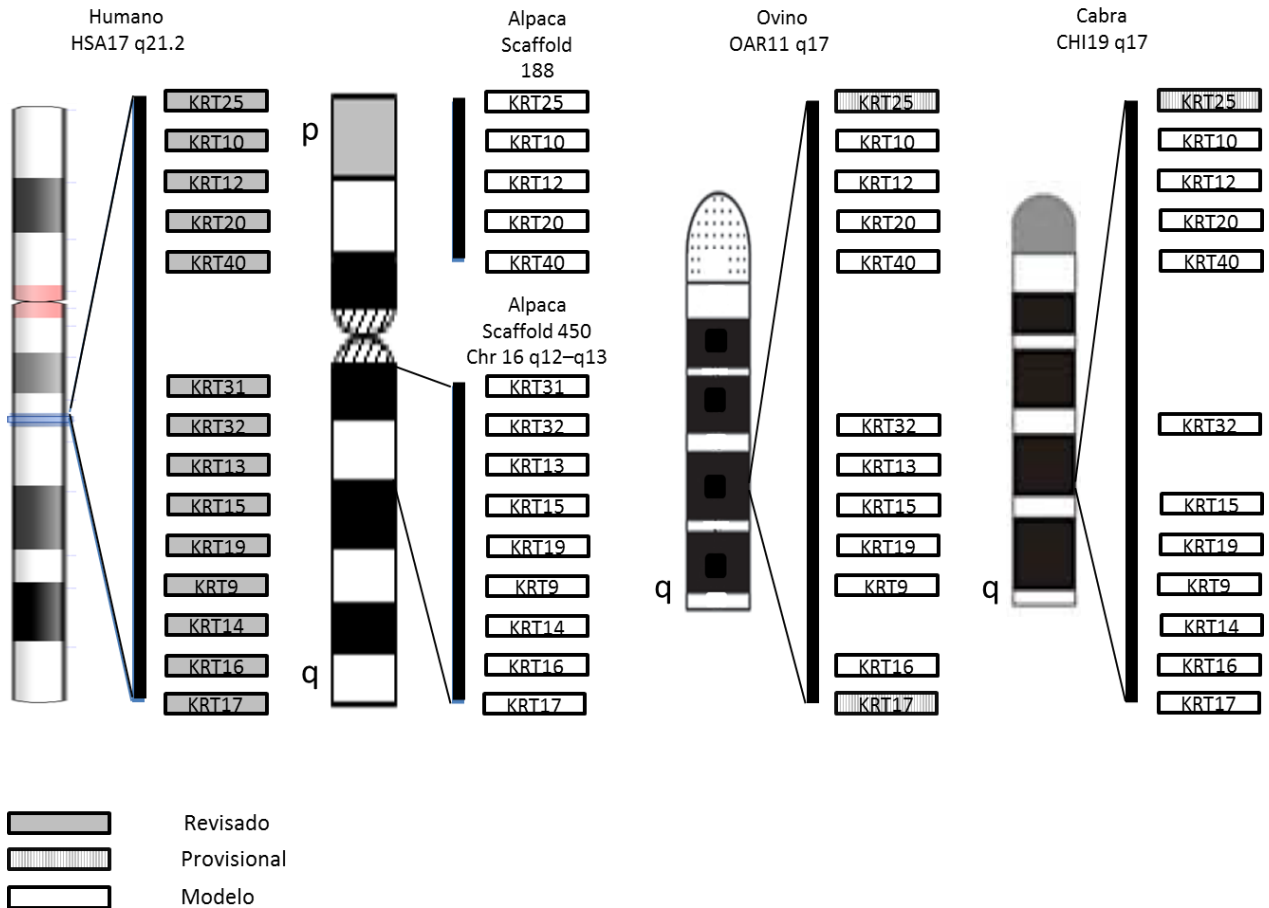


Figura 12. Representación comparativa de localización cromosómica del cluster de genes de queratina flanqueados por los genes *KRT25* y *KRT17*. Se observa la conservación del ordenamiento en tándem de este cluster de genes en las especies estudiadas y la sintenia que existe entre los cromosomas representados. No se tiene conocimiento de a que cromosoma de alpaca pertenece el scaffold 188. Nótese la ausencia del gen *KRT31* en ovino y cabra, del *KRT13* en cabra y del *KRT14* en ovino. Los ideogramas se obtuvieron del NCBI (humano), Avila *et al.* 2014 (alpaca), Goldammer *et al.* 2009 (ovino) y Schibler *et al.* 2009 (cabra). p= brazo corto del cromosoma. q= brazo largo del cromosoma. El estado de referencia para cada gen esta descrito en el NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK21091/>).

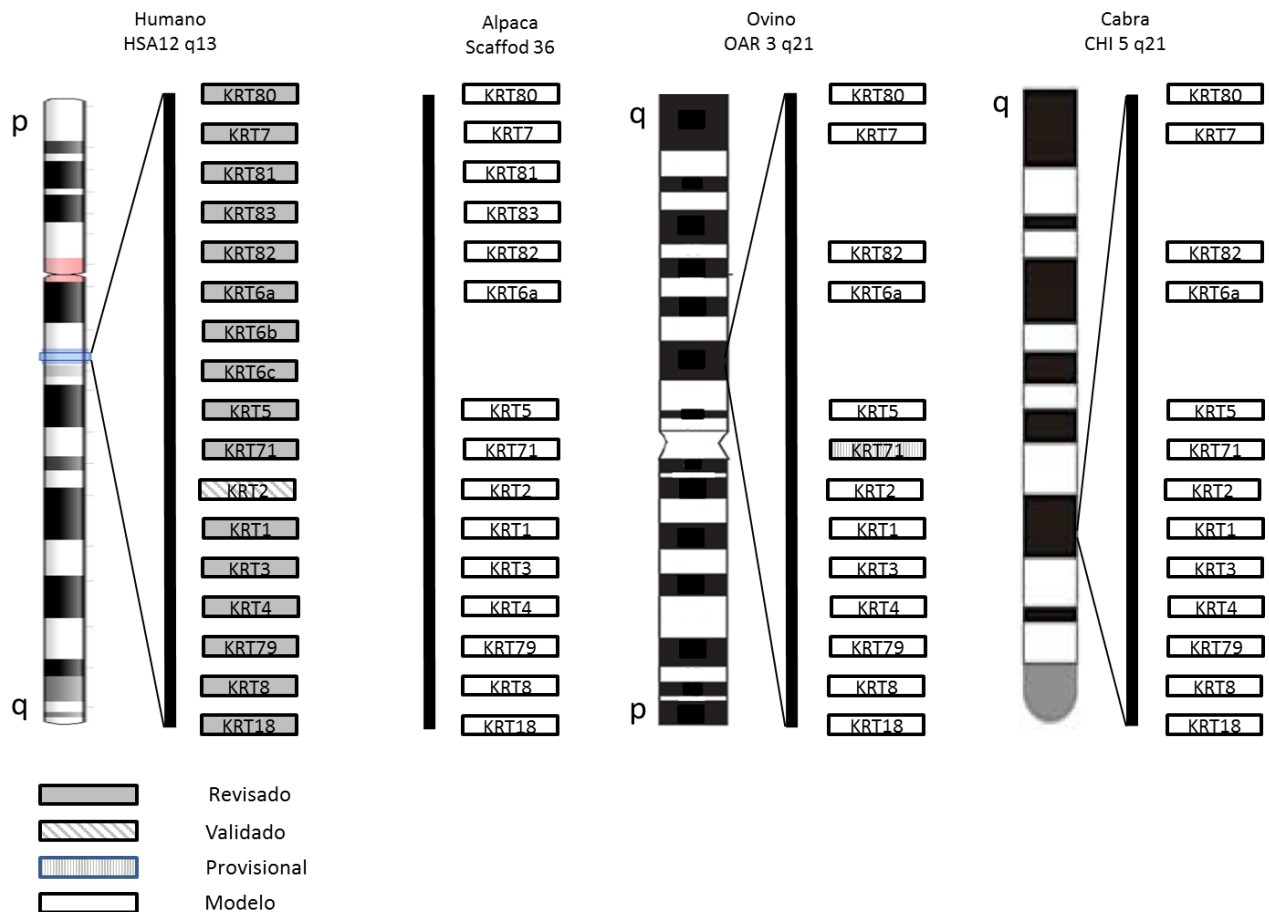


Figura 13. Representación comparativa de localización cromosómica del cluster de genes de queratina flanqueados por los genes *KRT80* y *KRT18*. Se observa la conservación del ordenamiento en tándem de este cluster de genes en las especies estudiadas y la sintenia que existe entre los cromosomas representados. Los cromosomas de ovino y cabra están representados en forma inversa para mantener la correspondencia en tándem que existe entre estos genes y que corresponde a una inversión del bloque cromosómico. No se tiene conocimiento de a que cromosoma de alpaca pertenece el scaffold 36. Nótese la ausencia de los genes *KRT6b* y *KRT6c* en alpaca, ovino y cabra y de los genes *KRT81* y *KRT83* en ovino y cabra. Los ideogramas se obtuvieron del NCBI (humano), Avila et. al. 2014 (alpaca), Goldammer et al. 2009 (ovino) y Schibler et al. 2009 (cabra). p= brazo corto del cromosoma. q= brazo largo del cromosoma. El estado de referencia para cada gen esta descrito en el NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK21091/>).

V. CONCLUSIONES

- Se predijo la ubicación de 14 PNS en genes de queratina del epitelio de la piel de tipo 1, 23 PNS en genes de queratina del epitelio de la piel de tipo 2, 4 PNS en genes de queratina de la fibra de tipo 1 y 7 PNS en genes de queratina de la fibra de tipo 2.
- Se desarrolló haplotipos para los genes ubicados en el scaffold 36, 188 y 450 del genoma de la alpaca Vicpac 2.0.2.
- Se pudo ratificar que los genes de queratina son genes conservados entre las especies estudiadas y que su distribución y ordenamiento en tándem en el genoma es muy similar entre estas especies.
- No se ubicaron PNSs en los genes *KRT2*, *KRT4*, *KRT6b*, *KRT6c*, *KRT79*, *KRT 10*, *KRT15*, *KRT 17* y *KRT19*.

VI. RECOMENDACIONES

- Validar los PNSs hallados en laboratorio y la comparación de estas secuencias con otras alpacas para verificar la presencia de los PNSs en el resto de la población.
- Realizar la búsqueda de PNSs en las secuencias colindantes a los genes *KRT2*, *KRT4*, *KRT6b*, *KRT6c*, *KRT79*, *KRT 10*, *KRT 15*, *KRT 17* y *KRT19*.
- Evaluar si los PNSs hallados puedan estar relacionados a diámetro de fibra.
- Evaluar y adicionar genes al posible haplotipo del scaffold 36, 450 y 188.

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Avila, F. (2014). Comparative mapping of the alpaca genome (Doctoral dissertation, Texas A & M University). Recuperada de <https://oaktrust.library.tamu.edu/bitstream/handle/1969.1/153632/FAGUNDESDEAVILA-DISSERTATION-2014.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

Badajoz, L.; Sandoval, C.; García, V. & Pezo, C. (2009). Descripción histológica del complejo folicular piloso en crías de alpacas. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, 20(2): 154-164. Recuperado de http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1609-91172009000200002

Brookes, A.J. (1999). The essence of SNPs. *Gene*, 234(2): 177-186. Doi: 10.1016/s0378-1119(99)00219-x

Bustanza, A.V. (2001). *La Alpaca. Conocimiento del gran potencial andino. Libro N° 1.* Universidad Nacional del Altiplano de Puno, Perú.

Calle, R. (1982). *Producción y mejoramiento de la alpaca.* Lima, Perú.

Chandramohan, B.; Renieri, C.; La Manna, V. & La Terza, A. (2013). The alpaca agouti gene: genomic locus, transcripts and causative mutations of eumelanic and pheomelanic coat color. *Gene*, 521(2): 303-10. Doi: 10.1016/j.gene.2013.03.060

Chandramohan, B.; Renieri, C.; La Manna, V. & La Terza, A. (2015). The alpaca melanocortin 1 receptor: gene mutations, transcripts, and relative levels of expression in ventral skin biopsies. *Sci. World J.* 2015: 265751. Doi: 10.1155/2015/265751

Charry, A.A. (1998). Soft rolling skin: is it a watershed for alpaca production. *EFFN News* 4: 8-12.

Chávez, L. (2008). Fibra de alpaca: Oportunidades para su aprovechamiento. *Negocios Internacionales COMEXPERU PE*, 11(129), 22-23.

Cransberg, R. & Munyard, K. Munyard. (2011). Polymorphisms detected in the tyrosinase and matp (slc45a2) genes did not explain coat colour dilution in a sample of Alpaca (*Vicugna pacos*). *Small Ruminant Research* 95(2-3):92-96. Doi: 10.1016/j.smallrumres.2010.10.004

Cristofanelli, S.; Antonini, M.; Torres, D.; Polidori, P. & Renieri, C. (2005). Meat and Carcass quality from Peruvian llama (*Lama glama*) and alpaca (*Lama pacos*). *Small Ruminant Research* 58 (3): 219-222. Doi: 10.1016/S0309-1740(03)00174-8

De Los Ríos, E. (2006). Producción textil de fibras de camélidos sudamericanos en el área altoandina de Bolivia, Ecuador y Perú. Organización de las Naciones Unidas para el Desarrollo Industrial (UNIDO). Recuperado de http://infoalpacas.com.pe/wp-content/uploads/2015/05/58563_camelidos_final.pdf.

Delgado De La Flor, I. (2014). Microsatélites e identificación de SNP en el gen de Tricohialina en alpacas (*Vicugna pacos*). Universidad Peruana Cayetano Heredia, Lima, Perú.

Elshire, R. J.; Glaubitz, J. C.; Sun, Q.; Poland, J. A.; Kawamoto, K.; Buckler, E. S. & Mitchell, S. E. (2011). A robust, simple genotyping-by-sequencing (GBS) approach for high diversity species. *PloS one*, 6(5), e19379. Recuperado de <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0019379>

Fernández, D. (2015). Búsqueda de genes relacionados a la síntesis de la fibra y marcadores SSR en los ESTs de piel de alpaca *Vicugna pacos*. Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima, Perú.

Foppiano, F. (2016). Caracterización de marcadores genéticos en genes que codifican a proteínas asociadas a queratina y evaluación de la asociación del gen KRTAP11-1 al diámetro de fibra en alpaca (*Vicugna pacos*) siguiendo una aproximación de gen candidato. Universidad Peruana Cayetano Heredia, Lima, Perú.

Goldammer, T.; Di Meo, GP.; Luhken, G.; Drogemuller, C.; Wu, CH.; Kijas, J.; Dalrymple, BP.;... Cockett, NE. (2009). Molecular Cytogenetics and Gene Mapping in Sheep (*ovis aries*, 2n=54). *Cytogenet Genome Res.* 126(1-2):63-76. Doi: 10.1159/000245907

Gong, H.; Zhou, H.; Mckenzie, G.; Yu, Z.; Clerens, S.; Dyer, J.; Plowman, J.;... Hickford, J. (2012). an Updated Nomenclature for Keratin-associated Proteins (KAPs). *International Journal off Biological Sciences* 2012; 8(2):258-264. Doi: 10.7150/ijbs.3278

GUZMÁN, K. (2011). Identificación de polimorfismos del gen *tlr4* en crías de alpacas con cuadros de neumonías por *Pasteurella multocida*. Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima, Perú.

Hesse, M.; Zimek, A.; Weber, K. & Magin, T. (2004). Comprehensive analysis of keratin gene clusters in humans and rodents. *Eur. J. Cell Biol.* 83; 19-26. Doi: 10.1078/0171-9335-00354

Hoffman, E. & Fowler ME. (1995). Fiber. In: *The alpaca book*. USA: Ed. Clay Press. P 44-84.

INEI. (1 de julio de 2012). Resultados Definitivos. IV Censo Nacional Agropecuario 2012. Recuperado de <https://sinia.minam.gob.pe/documentos/resultados-definitivos-iv-censo-nacional-agropecuario-2012>

Junqueira, L.C. & Carneiro, J. 1988. *Histología básica*. 3a ed. España: Ed. Salvat. 544 p.

Lacolla, D.; García, M.; Corredera, C. & Buey, V. (2010). Estructura histológica de la piel de los camélidos sudamericanos. *Ciencia Veterinaria.* 12 (1). Recuperado de <http://www.biblioteca.unlpam.edu.ar/pubpdf/revet/n12a02lacolla.pdf>

Mamani, C.; Gutiérrez, G. & Ponce De León, A. (2017). Identificación de polimorfismos de nucleótido simple en alpaca (*Vicugna pacos*) usando un panel de células híbridas irradiadas alpaca/hámster. Revista RICBA 1(2): 92-95. Recuperado de <http://revistas.untrm.edu.pe/index.php/ricba/article/view/242>

Mendoza, M. (2018). localización de genes y marcadores moleculares de alpaca (*Vicugna pacos*) mediante la técnica de hibridación fluorescente in situ (fish). Universidad Nacional Agraria La Molina, Lima, Perú.

Pariset, L.; Cappuccio, I.; Ajmone-MarSAN, P.; Bruford, M.; Dunner, S.; Cortes, O.; Erhardt, G.;... Consortium, E. (2006). Characterization of 37 Breed-Specific Single-Nucleotide Polymorphisms in Sheep. Journal of Heredity 2006:97(5):531–534. Doi: 10.1093/jhered/esl020

Ramensky, V.; Bork, P. & Sunyaev, S. (2002). Human non- synonymous SNPs: server and survey. Nucleic Acids Research 30: 3894-3900. Doi: 10.1093/nar/gkf493

Rodríguez, J. (2014). Caracterización de la variabilidad genética en regiones anónimas y codantes en alpacas (*Vicugna pacos*) peruanas mediante el análisis de ADN mitocondrial y ADN nuclear. Universidad Peruana Cayetano Heredia, Lima, Perú.

Rogers, G. (2004). Hair follicle differentiation and regulation. Int. J. Dev. Biolo. 48: 163-170. Doi: 10.1387/ijdb.021587gr

Schibler, L.; Di Meo, GP.; Cribiu, EP. & Lannuzzi, L. (2009). Molecular cytogenetics and comparative mapping in goats (*Capra hircus*, 2n = 60). Cytogenetic and Genome Research. 126:77–85. Doi: 10.1159/000245908

Schweizer, J.; Bowden, P.; Coulombe, P.; Langbein, L.; Lane, B.; Magin, T.; Maltais, L.;... Wright, M. (2006). New consensus nomenclature for mammalian keratins. The Journal of cell Biology, 174 (2): 169 – 174. Doi: 10.1083/jcb.200603161

Stanley, H.F.; Kadwell, M. & Wheeler, K.C. (1994). Molecular evolution of the family *Camelidae*: a mitochondrial DNA study. Proc R Soc Lond. B. 256:1-6. Doi <https://doi.org/10.1098/rspb.1994.0041>

Sulayman, A.; Tursun, M.; Sulaiman, Y.; Huang, X.; Tian, K.; Tian, Y.; Xu, X.;... Tulafu, H. (2018). Association analysis of polymorphisms in six keratin genes with wool traits in sheep. Asian-Australas J Anim Sci 31:775-783.

Thavamanikumar, S.; Mcmanus, L.J.; Tibbits, J.F.G. & Bossinger, G. (2011). The significance of single nucleotide polymorphisms (SNPs) in Eucalyptus obulus breeding programs. Australian Forestry 74:23-29. Doi <https://doi.org/10.1080/00049158.2011.10676342>

Torres De Jasuai, J.; Vélez, V.; Zegarra, J. & Díaz, G. (2007). Caracterización de la Histología de la piel de alpaca. Sitio Argentino de Producción Animal. APPA-ALPA-Cusco, Perú. Recuperado de http://www.produccion-animal.com.ar/produccion_de_camelidos/anatomia/149-Torres-Piel_alpacas.pdf

Wang, X.; Wang, L. & Liu, X. (2003). The Quality and Processing Performance of Alpaca Fibres: A report for the Rural Industries Research and Development Corporation. RIRDC Publication N° 03/128. Australia. 132 pág. Recuperado de <https://www.agrifutures.com.au/wp-content/uploads/publications/03-128.pdf>

VIII. ANEXOS

ANEXO 1. Identificación de polimorfismos de nucleótido simple deseados (rojo) y eliminados (azul).

Vicugna pacos huacaya unplaced genomic scaffold scaffold853, whole genome shotgun sequence
 Sequence ID: [KN269095.1](#) Length: 1193726 Number of Matches: 1

Range 1: 1022820 to 1023207		GenBank	Graphics	▼ Next Match	▲ Previous Match
Score	Expect	Identities	Gaps	Strand	
695 bits(376)	0.0	384/388(99%)	0/388(0%)	Plus/Plus	
Query 1	GTGGGTGGGCCAGGTGGGTGGCTCTGGTGGTGGAGTGTTGATAGAGGCTGTGGCTGCAGT				60
Sbjct 1022820	GTGGGTGGGCCAGGTGGGTGGCTCTGGTGGTGGAGTGTTGATAGAGGCTGTGGCTGCAGT				1022879
Query 61	GGCCCTTAGCAAAGTCTTGGTggcatctccattttacaggaGCCTGAGGTCCGCCTTC				120
Sbjct 1022880	GGCCCTTAGCAAAGTCTTGGTGGCATCTCCATTTACAGGGAGCCTGAGGTCTGCCTTT				1022939
Query 121	GGGGAGTGGCCCTGGGCCACTTAGAATTGATGGCAGAAGGTCCCTTTTCAGCATCAAGGC				180
Sbjct 1022940	GGGGAGTGGCCCTGGGCCACTTAGAATTGATGGCAGAAGGTCCCTTTTCAGCATCAAGGC				1022999
Query 181	ATCTGAGCGGGCCTGGTACCCTGAATCTCTTATTCCCTGCAAGCATTCTTTGCACTCAGC				240
Sbjct 1023000	ATCTGAGTGGGCCTGGTACCCTGAATCTCTTATTCCCTGCAAGCATTCTTTGCACTCAGC				1023059
Query 241	TTCTCTCAGCCTCGGGCCAGGATGGGGTGGTGGAGATGTGGGGTGCATCCTCTACACAT				300
Sbjct 1023060	TTCTCTCAGCCTCGGGCCAGGATGGGGTGGTGGAGATGTGGGGTGCATCCTCTACACAT				1023119
Query 301	GCTGAGCTGGGTGGAGAAGGCATCCCAGGCTGTTTGGGGGAGTGGAAAGTTCTGACCTACC				360
Sbjct 1023120	GCTGAGCTGGGTGGAGAAGGCATCCCAGGCTGTTTGGGGGAGTGGAAAGTTCTGACCTACC				1023179
Query 361	AGCCAGATGACCCCAAGATTGGGGAGG	388			
Sbjct 1023180	AGCCAGATGACCCCAAGATTGGGGAGG	1023207			

ANEXO 2. Ubicación e identificación de los polimorfismos de nucleótido simple predichos en el genoma de la alpaca en genes de queratina del epitelio de la piel de tipo I

GEN	Lugar de búsqueda	Vicpac 2.0.2		Vi.pacos 1.0	
		Scaffold	Extensión	Scaffold	Extensión
<i>KRT9</i>	Intrón 6	450	165431- 165109	853	1059007- 1059329
	Intrón 6		165431- 165109		1059007- 1059329
<i>KRT12</i>	Exón 7	188	3304205- 3304145	79	183230- 183290
	Intrón 6		3304752- 3304206		182682- 183229
<i>KRT13</i>	Exón 1	450	113722- 114113	853	1109505- 1109896
<i>KRT14</i>	Exón 1	450	181494- 182009	853	1042556- 1043071
	Intrón 1		180072- 181307		1043258- 1044493
<i>KRT16</i>	Exón 8	450	199863- 200118	853	1024869- 1025124
	Intrón 1		201780- 202167		1022820- 1023207
<i>KRT18</i>	Intrón 1	36	10883293- 10883914	82	6756000- 6756621
	Exón 1	36	10882609- 10882794	82	6755316- 6755501
<i>KRT20</i>	Intrón 2	188	3319003- 3319969	79	167548- 168516
<i>KRT25</i>	Intrón 1	188	3221084- 3221383	79	263716- 264016

ANEXO 3. Ubicación e identificación de los polimorfismos de nucleótido simple predichos en el genoma de la alpaca en genes de queratina del epitelio de la piel de tipo II

GEN	Lugar de búsqueda	Vicpac 2.0.2		Vi.pacos 1.0	
		Scaffold	Extensión	Scaffold	Extensión
<i>KRT1</i>	Intrón 2	36	10710021-10710338	82	6584428-6584745
	Exón 9		10707154-10707455		6581561-6581862
<i>KRT3</i>	Intrón 5	36	10757388-10757783	82	6631535-6631930
	Intrón 1		10761269-10761548		6635416-6635695
<i>KRT5</i>	Intrón 7	36	10578444-10579170	82	6456789-6457515
	Intrón 7		10578444-10579170		6457515-6456789
<i>KRT6a</i>	Exón 1	36	10539596-10539753	82	6419452-6419609
	Exón 9		10536390-10536513		6416247-6416370
<i>KRT7</i>	Intrón 2	36	10341818-10342053	82	6224519-6224754
	Intrón 6		10347751-10348261		6230450-6230960
<i>KRT8</i>	Intrón 1	36	10848917-10849492	82	6721677-6722252
<i>KRT71</i>	Exón 9	36	10608511-10608990	82	6486506-6487013
	Intrón 1		10614413-10615036		6492435-6493058

	Intrón 8		10609307- 10610114		6487330- 6488137
<i>KRT80</i>	Intrón 2	36	10284360- 10286180	82	6168361- 6170181

ANEXO 4. Ubicación e identificación de los polimorfismos de nucleótido simple predichos en el genoma de la alpaca en genes de queratina de la fibra de tipo I

GEN	Lugar de búsqueda	Vicpac 2.0.2		Vi.pacos 1.0	
		Scaffold	Extensión	Scaffold	Extensión
<i>KRT31</i>	Intrón 6	450	50310- 50607	853	1172148- 1172445
<i>KRT32</i>	Intrón 5	450	15344- 15502	853	1189375- 1189533
<i>KRT40</i>	Intrón 5	188	3400638- 3401191	79	56100- 86657

ANEXO 5. Ubicación e identificación de los polimorfismos de nucleótido simple predichos en el genoma de la alpaca en genes de queratina de la fibra de tipo II

GEN	Lugar de búsqueda	Vicpac 2.0.2		Vi.pacos 1.0	
		Scaffold	Extensión	Scaffold	Extensión
<i>KRT81</i>	Exón 9	36	10411682- 10411830	82	6293268- 6293416
	Intrón 6		10413117- 10413483		6294703- 6295069
<i>KRT82</i>	Intrón 5	36	10485865- 10486934	82	6367675- 6368695
<i>KRT83</i>	Intrón 1	36	10416199- 10417775	82	6297785- 6299361