

**UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA  
LA MOLINA**

**FACULTAD DE CIENCIAS**



**“ANÁLISIS DE LA VARIABILIDAD ENTRE ESPECIES DE  
CAMÉLIDOS SUDAMERICANOS UTILIZANDO GENES  
RELACIONADOS A LA INMUNIDAD”**

**TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO DE  
BIÓLOGO**

**ANTHONY MIJAIL ROMERO QWISTGAARD**

**LIMA - PERÚ**

**2022**

---

La UNALM es titular de los derechos patrimoniales de la presente investigación  
(Art. 24 – Reglamento de propiedad Intelectual)

**UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA  
LA MOLINA**

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**“ANÁLISIS DE LA VARIABILIDAD ENTRE ESPECIES DE  
CAMÉLIDOS SUDAMERICANOS UTILIZANDO GENES  
RELACIONADOS A LA INMUNIDAD”**

Presentada por:

**ANTHONY MIJAIL ROMERO QWISTGAARD**

Tesis para Optar el Título Profesional de:

**BIÓLOGO**

Sustentada y aprobada por el siguiente jurado:

---

Mg.Sc. César López Bonilla  
PRESIDENTE

---

Mg.Sc. Roberto Carlos Mansilla Samaniego  
MIEMBRO

---

Mg.Sc. María del Rosario Castro Muñoz  
MIEMBRO

---

Ph.D. Gustavo Augusto Gutierrez Reynoso  
ASESOR

---

Lic. Daniel Saúl Oré Chávez  
Co Asesor

## **DEDICATORIA**

*A mis padres, Orlando Romero Flores y Sara Qwistgaard Horna, por su infinito apoyo y consejos de superación que inculcaron en mi*

*A mis hermanos Greisy, Russell y Romina, por su apoyo emocional para seguir adelante*

*A todos mis familiares y amigos*

*A la memoria de Obdulia Quiroga Ávila*

## AGRADECIMIENTOS

A mi asesor el Dr. Gustavo Gutierrez por su apoyo, orientación y confianza en la elaboración de la presente tesis. A mi jurado calificador el Mg. Sc. Cesar López Bonilla, el Mg. Sc. Roberto Mansilla Samaniego y la Mg. Sc. María del Rosario Castro Muñoz.

A mi co-asesor el Biólogo Daniel Oré Chávez por su confianza y enseñanzas durante mis prácticas profesionales en la Universidad Nacional Mayor de San Marcos y en donde nació la idea para la elaboración de mi tesis.

A todo el equipo y excompañeros del laboratorio de ecología molecular y biodiversidad: Miguel Tineo, Mariela Carrasco, Johnny Dávila, Bryan Reyes, Renzo Cortez, Heily Plaza, Andrea Pacheco, Fiorella Jiménez, Wendy Huamán, Darling Fernández y Marcos Retamoso por su apoyo en la extracción de ADN y elaboración de PCR. Entre risas y errores logre aprender más de lo que esperaba.

A Sergio Barahona quien con sus correcciones estrictas y ayuda logre obtener mayores conocimientos

Al Dr. Teodosio Huanca Mamani que gracias a su autorización logre obtener las muestras de alpacas y llamas. Así mismo, esto no hubiera sido posible sin el apoyo del Dr. Rubén Mamani, al ingeniero Rómulo, Luis Incahuaman, Mario Cabana, Ever Apaza, Fodi Huarcaya y luz Hinojosa.

A los biólogos Allan Flores Ramos y Santiago Paredes, jefe y especialista respectivamente de la Reserva Nacional Pampa Galeras-Bárbara D'Achille por su autorización para la colecta de muestras de vicuñas. Agradecer también a Liz Contreras y Paul Ramos por su apoyo en la toma de muestras.

A mis amigos de toda la vida Jordan Carranza, Marcio Moreno y Gianmarco Fattorini cuyos ánimos y apoyo no permitieron que me rindiera.

# ÍNDICE GENERAL

RESUMEN.....	x
ABSTRACT.....	xi
I. INTRODUCCIÓN .....	1
II. REVISIÓN DE LITERATURA .....	3
2.1 Camélidos Sudamericanos .....	3
2.1.1 Taxonomía .....	3
2.1.2 Origen y evolución .....	4
2.1.3 Distribución geográfica .....	6
2.1.4 Domesticación .....	7
2.2 Selección artificial.....	8
2.3 Sistema inmune .....	10
2.4 Receptores de tipo toll (TLR's).....	10
2.4.1 Repeticiones ricas en Leucinas (LRR) .....	12
2.4.2 <i>TLR2</i> .....	14
2.4.3 <i>TLR4</i> .....	14
2.5 Complejo Mayor de Histocompatibilidad (MHC).....	14
2.6 Cebadores .....	17
2.6.1 Diseño de cebadores .....	17
2.7 Diversidad genética.....	18
2.8 Red y estimación de haplotipos .....	19
III. MATERIALES Y MÉTODOS.....	21
3.1 Lugar de muestreo.....	21
3.2 Toma de muestra.....	22
3.3 Procesamiento de las muestras.....	23
3.4 Extracción y evaluación de ADN a partir de glóbulos blancos .....	23

3.5	Cuantificación de ADN.....	24
3.6	Amplificación de los genes <i>TLR2</i> y <i>TLR4</i> .....	25
3.6.1	Diseño de cebadores .....	25
3.6.2	Amplificación de la región LRR de los genes <i>TLR2</i> y <i>TLR4</i> mediante PCR .....	27
3.7	Amplificación de los genes <i>DPB1</i> , <i>DQB1</i> y <i>DRB1</i> del complejo mayor de histocompatibilidad clase II (MHCII) .....	28
3.7.1	Diseño de cebadores .....	28
3.7.2	Amplificación del exón 2 para los genes <i>DPB1</i> , <i>DQR1</i> y <i>DRB1</i> del MHC clase II mediante PCR.....	30
3.8	Secuenciamiento .....	32
3.9	Calidad de secuencias .....	32
3.10	Reconstrucción de haplotipos .....	32
3.11	Análisis de la diversidad genética.....	33
3.11.1	Número de haplotipos (h).....	33
3.11.2	Número de sitios polimórficos (S).....	33
3.11.3	Número promedio de diferencias nucleotídicas (k).....	34
3.11.4	Estimador de Watterson Theta-W ( $\theta_w$ ).....	34
3.11.5	Diversidad haplotípica ( $H_d$ ) .....	35
3.11.6	Diversidad nucleotídica ( $\pi$ ).....	35
3.12	Pruebas de neutralidad .....	36
3.12.1	D de Tajima .....	36
3.12.2	Fs de Fu .....	37
3.12.3	D* de Fu y Li.....	38
3.12.4	Estadístico R2 .....	39
3.13	Elaboración de la red de haplotipos .....	40
3.14	Estimación del grado de diferenciación genética.....	40
3.15	Determinación de cambios aminoacídicos.....	41

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	42
4.1 Extracción de ADN.....	42
4.2 Amplificación de los genes .....	44
4.2.1 Diseño de cebadores .....	44
4.2.2 Amplificación de los genes mediante PCR punto final.....	58
4.3 Secuenciamiento .....	62
4.4 Reconstrucción de haplotipos .....	63
4.5 Diversidad molecular .....	68
4.6 Diversidad genética.....	76
4.7 Red de haplotipos.....	80
4.9 Diferenciación genética.....	87
4.10 Identificación de cambios aminoacídicos .....	89
V. CONCLUSIONES.....	91
VI. RECOMENDACIONES .....	92
VII. BIBLIOGRAFÍA .....	93
VIII. ANEXOS .....	107

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Secuencia de cebadores usados para la amplificación de la región LRR en los genes <i>TLR2</i> y <i>TLR4</i> en camélidos .....	26
Tabla 2: Protocolo de amplificación de la región LRR en los genes <i>TLR2</i> y <i>TLR4</i> .....	27
Tabla 3: Programa de amplificación de la región LRR en los genes <i>TLR2</i> y <i>TLR4</i> .....	28
Tabla 4: Nomenclatura IUPAC para el sistema de bases nucleotídicas degeneradas .....	29
Tabla 5: Secuencia de cebadores usados para la amplificación del exón 2 en los genes <i>DPB1</i> , <i>DQB1</i> y <i>DRB1</i> del MHC clase II en camélidos.....	30
Tabla 6: Protocolo de amplificación del exón 2 para los genes <i>DPB1</i> , <i>DQB1</i> y <i>DRB1</i> del MHC clase II.....	31
Tabla 7: Programa de amplificación para el exón 2 de los genes <i>DPB1</i> , <i>DQB1</i> y <i>DRB1</i> del MHC clase II .....	31
Tabla 8: Identificación de sitios polimórficos en las repeticiones ricas en leucinas de los genes <i>TLR2</i> y <i>TLR4</i> y en el exón 2 del gen <i>DRB1</i> en tres especies de camélidos sudamericanos .....	64
Tabla 9: Lista de haplotipos más probables en la región LRR para el gen <i>TLR2</i> dentro de las 3 especies de camélidos sudamericanos .....	67
Tabla 10: Lista de haplotipos más probables en la región LRR para el gen <i>TLR4</i> dentro de las 3 especies de camélidos sudamericanos .....	67
Tabla 11: Lista de haplotipos más probables para el exón 2 del gen <i>DRB1</i> dentro de las 3 especies de camélidos sudamericanos .....	68
Tabla 12: BLAST obtenido al comparar las secuencias resultantes con las secuencias de referencias en el GeneBank.....	69
Tabla 13: Caracterización molecular de las repeticiones ricas en leucinas de los genes <i>TLR2</i> y <i>TLR4</i> y del exón 2 <i>DRB1</i> en las tres especies de camélidos sudamericanos .....	73
Tabla 14: Valores de los índices de diversidad genética en las repeticiones ricas en leucinas de los genes <i>TLR2</i> y <i>TLR4</i> y exón 2 del gen <i>DRB1</i> para tres especies de camélidos sudamericanos .....	79

Tabla 15: Lista de haplotipos y su frecuencia dentro de la población de camélidos sudamericanos para la región LRR del gen <i>TLR2</i> .....	81
Tabla 16: Lista de haplotipos y su frecuencia dentro de la población de camélidos sudamericanos para la región LRR del gen <i>TLR4</i> .....	83
Tabla 17: Lista de haplotipos y su frecuencia dentro de la población de camélidos sudamericanos para el exón 2 del gen <i>DRB1</i> .....	84
Tabla 18: Pruebas de neutralidad.....	87
Tabla 19: Comparaciones genéticas $F_{ST}$ para la región LRR del gen <i>TLR2</i> por pares entre las tres especies de camélidos sudamericanos.....	88
Tabla 20: Comparaciones genéticas $F_{ST}$ para la región LRR del gen <i>TLR4</i> por pares entre las tres especies de camélidos sudamericanos.....	88
Tabla 21: Comparaciones genéticas $F_{ST}$ para el exón 2 del gen <i>DRB1</i> por pares entre las tres especies de camélidos sudamericanos.....	89
Tabla 22: Cambios de aminoácidos dentro de las repeticiones ricas en leucinas de los genes <i>TLR2</i> y <i>TLR4</i> y el exón 2 del gen <i>DRB1</i> .....	90

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Origen y distribución ancestral de los camélidos.....	6
Figura 2. Distribución geográfica y poblacional de las especies de camélidos en América del sur .....	7
Figura 3. Familia de receptores tipo toll (TLR) y los diferentes patrones moleculares asociados a patógenos. ....	11
Figura 4. Esquema general de la cascada de señalización.....	12
Figura 5. Estructura de una cadena polipeptídica del TLR. ....	13
Figura 6. Vías de presentación de antígenos endógenos y exógenos .....	16
Figura 7. Ubicación de los puntos de muestreo.....	21
Figura 8. Toma de muestra sanguínea.....	22
Figura 9. Equipo Nanodrop <sup>TM</sup> para cuantificación de ADN. ....	25
Figura 10. Evaluación de la calidad de ADN por electroforesis en alpacas.....	42
Figura 11. Evaluación de la calidad de ADN por electroforesis en llamas.....	43
Figura 12. Evaluación de la calidad de ADN por electroforesis en vicuñas .....	43
Figura 13. Alineamiento del cebador <i>forward</i> y <i>reverse</i> para el gen <i>TLR2</i> en animales del orden <i>Artiodactyla</i> y <i>Perissodactyla</i> . ....	45
Figura 14. Alineamiento del cebador <i>forward</i> y <i>reverse</i> para el gen <i>TLR2</i> en especies ganaderas.....	46
Figura 15. Alineamiento del cebador <i>forward</i> y <i>reverse</i> para el gen <i>TLR2</i> en la familia <i>Camelidae</i> . ....	46
Figura 16. Análisis fisicoquímico del cebador <i>forward</i> para el gen <i>TLR2</i> .....	47
Figura 17. Análisis fisicoquímico del cebador <i>reverse</i> para el gen <i>TLR2</i> .....	47
Figura 18. Análisis <i>hetero-dimer</i> de los cebadores <i>forward</i> y <i>reverse</i> para el gen <i>TLR2</i> .....	48
Figura 19. Alineamiento del cebador <i>forward</i> y <i>reverse</i> para el gen <i>TLR4</i> en animales del orden <i>Artiodactyla</i> y <i>Perissodactyla</i> . ....	48

Figura 20. Alineamiento del cebador <i>forward</i> y <i>reverse</i> para el gen <i>TLR4</i> en especies ganaderas.....	49
Figura 21. Alineamiento del cebador <i>forward</i> y <i>reverse</i> para el gen <i>TLR4</i> en la familia <i>Camelidae</i> . ....	49
Figura 22. Análisis fisicoquímico del cebador <i>forward</i> para el gen <i>TLR4</i> .....	50
Figura 23. Análisis fisicoquímico del cebador <i>reverse</i> para el gen <i>TLR4</i> .....	50
Figura 24. Análisis <i>hetero-dimer</i> de los cebadores <i>forward</i> y <i>reverse</i> para el gen <i>TLR4</i> .....	51
Figura 25. Alineamiento del cebador <i>forward</i> y <i>reverse</i> para el gen <i>DPBI</i> en la familia <i>Camelidae</i> . ....	51
Figura 26. Análisis fisicoquímico del cebador <i>forward</i> para el gen <i>DPBI</i> .....	52
Figura 27. Análisis fisicoquímico del cebador <i>reverse</i> para el gen <i>DPBI</i> .....	52
Figura 28. Análisis <i>hetero-dimer</i> de los cebadores <i>forward</i> y <i>reverse</i> para el gen <i>DPBI</i> .....	53
Figura 29. Alineamiento del cebador <i>forward</i> y <i>reverse</i> para el gen <i>DQBI</i> en la familia <i>Camelidae</i> . ....	53
Figura 30. Análisis fisicoquímico del cebador <i>forward</i> para el gen <i>DQBI</i> .....	54
Figura 31. Análisis fisicoquímico del cebador <i>reverse</i> para el gen <i>DQBI</i> .....	54
Figura 32. Análisis <i>hetero-dimer</i> de los cebadores <i>forward</i> y <i>reverse</i> para el gen <i>DQBI</i> .....	55
Figura 33. Alineamiento del cebador <i>forward</i> y <i>reverse</i> para el gen <i>DRBI</i> en la familia <i>Camelidae</i> . ....	55
Figura 34. Análisis fisicoquímico del cebador <i>forward</i> para el gen <i>DRBI</i> .....	56
Figura 35. Análisis fisicoquímico del cebador <i>reverse</i> para el gen <i>DRBI</i> .....	56
Figura 36. Análisis <i>hetero-dimer</i> de los cebadores <i>forward</i> y <i>reverse</i> para el gen <i>DRBI</i> .....	57
Figura 37. Amplificación de la región LRR del gen <i>TLR2</i> . ....	59
Figura 38. Amplificación de la región LRR del gen <i>TLR4</i> . ....	59
Figura 39. Amplificación del exón 2 en el gen <i>DPBI</i> .....	60

Figura 40. Amplificación del exón 2 en el gen <i>DQB1</i> . .....	60
Figura 41. Amplificación del exón 2 en el gen <i>DRB1</i> . .....	61
Figura 42. Electroferograma parcial de una muestra. ....	62
Figura 43. Gen <i>TLR2</i> de <i>Vicugna pacos</i> registrado en el GeneBank .....	70
Figura 44. Región LRR para el gen <i>TLR2</i> amplificada y secuenciada en este estudio .....	70
Figura 45. Gen <i>TLR4</i> de <i>Vicugna pacos</i> registrado en el GeneBank .....	71
Figura 46. Región LRR para el gen <i>TLR4</i> amplificada y secuenciada en este estudio .....	71
Figura 47. Gen <i>DRB1</i> de <i>Vicugna pacos</i> registrado en el GeneBank .....	72
Figura 48. Exón número 2 del gen <i>DRB1</i> amplificado y secuenciado en este estudio .....	72
Figura 49. Red de haplotipos para la región LRR del gen <i>TLR2</i> . ....	80
Figura 50. Red de haplotipos para la región LRR del gen <i>TLR4</i> . ....	82
Figura 51. Red de haplotipos para el exón 2 del gen <i>DRB1</i> .....	83

## ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1: Registro de camélidos domésticos .....	108
Anexo 2: Registro de camélidos silvestres .....	111
Anexo 3: Cuantificación de ADN nuclear en las especies de camélidos .....	112
Anexo 4: Alineamiento múltiple para la región LRR del gen TLR2 .....	115
Anexo 5: Alineamiento múltiple para la región LRR del gen TLR4 .....	125
Anexo 6: Alineamiento múltiple para el exón 2 del gen DRB1 .....	131
Anexo 7: Alineamiento múltiple de aminoácidos para la región LRR del gen TLR2 .....	134
Anexo 8: Alineamiento múltiple de aminoácidos para la región LRR del gen TLR4 .....	138
Anexo 9: Alineamiento múltiple de aminoácidos para el exón 2 del gen DRB1 .....	140

## RESUMEN

El presente estudio evaluó la diversidad genética presente en genes relacionados a la inmunidad dentro de 3 especies de camélidos sudamericanos (*Vicugna pacos*, *Lama glama* y *Vicugna vicugna*) con el fin de evidenciar si las especies salvajes presentan una mayor variabilidad en comparación con sus parientes domesticados. Se obtuvo el ADN nuclear mediante la extracción de glóbulos blancos por la metodología *Salting out* (Aljanabi & Martinez, 1997) modificado por el laboratorio de ecología molecular y biodiversidad de la UNMSM. Posteriormente se amplificaron por PCR de punto final las regiones ricas en Leucinas de los genes Toll Like Receptor y los exones número 2 del MHC clase II mediante cebadores elaborados específicamente para camélidos. Los productos de la amplificación fueron secuenciados obteniéndose 49 secuencias para el gen TLR2, 54 para el gen TLR4 y 20 pertenecientes al gen DRB1 del MHC clase II para posteriormente realizar una estimación de los haplotipos parentales más probables (PHASE) y con ello poder hacer el análisis de la diversidad y diferenciación genética. Se obtuvieron un total de 40 haplotipos diferentes y 25 sitios polimórficos distribuidos entre los tres genes evaluados. El análisis evidenció una variabilidad ligeramente alta del gen TLR2 dentro de la población de vicuñas y una alta variabilidad del gen TLR4 en llamas. La diferenciación genética fue muy elevada entre llamas y vicuñas y moderada entre alpacas y vicuñas. Se concluye que las alpacas, llamas y vicuña presentan una similar variabilidad genética para las regiones LRR en los genes *TLR2* y *TLR4* y para el exón 2 del gen *DRB1*. Este es el primer trabajo que analiza la diversidad de genes ligados a la inmunidad dentro de la población de camélidos sudamericanos.

Palabras clave: camélidos sudamericanos, variabilidad genética, diferenciación genética, TLR, MHC clase II, haplotipos.

## ABSTRACT

This study assessed the genetic diversity present in immunity-related genes within 3 South American camelids species (*Vicugna pacos*, *Lama glama* and *Vicugna vicugna*) to show whether wild species have greater variability compared to their domesticated relatives. Nuclear DNA was obtained by the extraction of white blood cells by Salting out (Aljanabi & Martinez, 1997) methodology modified by UNMSM's molecular ecology and biodiversity laboratory. Subsequently, the Leucine-rich regions of the Toll-Like Receptor genes and the number 2 exons of the MHC class II were amplified by end-point PCR by primers made specifically for camelids. The amplification products were sequenced obtaining 49 sequences for the *TLR2* gene, 54 for the *TLR4* gene, and 20 belonging to the *DRB1* gene of the Class II MHC and subsequently perform an estimate of the most likely parental haplotypes (PHASE) and thus be able to analyze diversity and genetic differentiation. A total of 40 different haplotypes and 25 polymorphic sites were obtained distributed among the three genes evaluated. The analysis showed slightly high variability of the *TLR2* gene within the vicuña population and high variability of the *TLR4* gene on llamas. Genetic differentiation was remarkably high between llamas and vicuñas and moderate between alpacas and vicuñas. It is concluded that alpacas, llamas, and vicuña exhibit a similar genetic variability for the LRR regions in the *TLR2* and *TLR4* genes and for exon 2 of the *DRB1* gene. This is the first work that analyses the diversity of immunity-linked genes within the South American camelid's population.

Keywords: South American camelids, genetic variability, genetic differentiation, TLR, MHC class II, haplotypes.

## I. INTRODUCCIÓN

Durante los miles de años que ha durado el proceso de domesticación, los seres humanos mediante la selección han modificado el fenotipo de varios organismos silvestres para obtener las actuales formas domesticadas. De esta estrecha relación mejorador-organismo, estos animales domésticos han adquirido valor económico, cultural y científico (p.e. ser empleados como modelos para investigaciones) (Alves et al., 2015).

Entre los camélidos sudamericanos la alpaca y llama son formas domésticas, mientras que la vicuña y guanaco son formas silvestres, llegando a un estimado de 7.5 millones de cabezas de ganado en América del Sur. Su proceso de domesticación ha sido dirigido hacia la obtención de carne de alto valor proteico y bajo colesterol (llama) y fibras de menor grosor (alpaca) (Brenes et al., 2001; Mamani et al., 2009).

Aquellas poblaciones de mamíferos que han sido domesticadas presentan una menor diversidad en regiones codificantes del genoma en comparación a sus respectivas poblaciones silvestres, por ejemplo, en poblaciones domesticadas de cerdos (Li et al., 2010; Yang et al., 2013) y conejos (Abrantes et al., 2013; Magalhães et al., 2015) se ha detectado una menor diversidad en genes relacionados a la respuesta inmune respecto a las poblaciones silvestres. Además, estudios realizados por Aguilar (2011), sustentan que el sistema de manejo en cautiverio de las vicuñas está reduciendo su diversidad genética aun cuando esta no es una especie domesticable. Esta baja diversidad presentada en las poblaciones domesticadas puede verse reflejada en una disminución de los polimorfismos de ciertos genes como en el de los receptores tipo Toll (TLR); los cuales tienen una profunda influencia en las respuestas a una amplia gama de patógenos y están asociados con la resistencia y/o susceptibilidad a enfermedades (Lazarus et al., 2002), así como en los genes MHC clase II; los cuales son los genes con mayor presencia de polimorfismos dentro de un individuo (Abbas et al., 2012; Owen et al., 2013, Murphy et al., 2017).

Por tal motivo, es posible que en el proceso de domesticación de los camélidos sudamericanos hayamos perdido diversidad genética respecto a la inmunidad, es claro que

ganamos carne y fibra, pero es posible que en el proceso perdimos otra cosa y he allí una de las causas del problema.

Esta investigación es necesaria para conocer el estado presente de la capacidad de la respuesta inmune de nuestros camélidos domesticados. Si es que estos presentan una pérdida de diversidad en regiones del genoma involucrado a la respuesta inmune proponer cambios en el manejo del recurso hacia el incremento de este tipo de diversidad que permitiría sumado al mejoramiento de pastizales, fármacos y vacunas disminuir con mayor eficacia enfermedades de importancia clínica. Los resultados beneficiaran a la comunidad científica, sea cual fuese el resultado, la visión de la propuesta aún no se ha realizado en el país permitiendo aplicarla a otros recursos domesticados; como el ganado vacuno y ovino criollo, así como el tradicional cuy.

Por lo tanto, el presente trabajo realizado tiene como objetivo principal comparar la variabilidad genética analizando las regiones moleculares de reconocimiento a antígenos de los genes TLR2, TLR4 y MHC clase II en poblaciones peruanas de llamas (*Lama glama*), alpacas (*Vicugna pacos*) y vicuñas (*Vicugna vicugna*). Así como de sus objetivos específicos de: elaboración de cebadores específicos para la región LRR de los genes TLR2, TLR4 y exón 2 de los genes del MHC clase II, determinación de sitios polimórficos en los genes TLR2, TLR4 y MHC clase II en las especies de camélidos sudamericanos, evaluar la variabilidad de los genes TLR2, TLR4 y MHC clase II dentro de las poblaciones de camélidos sudamericanos y determinar el grado de diferenciación genética entre especies de camélidos sudamericanos silvestres y domésticos usando como referencia a los genes TLR2, TLR4 y MHC clase II.

## II. REVISIÓN DE LITERATURA

### 2.1 Camélidos Sudamericanos

#### 2.1.1 Taxonomía

Los camélidos sudamericanos se clasifican junto con los camellos dentro de la familia Camelidae; subdividida en las tribus Lamini (Sudamérica) y Camelini (Asia central y África), suborden Tylopoda y en el orden Artiodactyla. En la actualidad hay cuatro especies de camélidos sudamericanos representados por la vicuña (*Vicugna vicugna*), el guanaco (*Lama guanicoe*), la llama (*Lama glama*) y la alpaca (*Vicugna pacos*) (Wheeler, 2005). Por lo tanto, la clasificación taxonómica utilizada será la siguiente:

**Dominio** Eukaryota

**Reino** Animalia

**Filo** Chordata

**Clase** Mammalia

**Orden** Artiodactyla

**Familia** Camelidae

**Tribu** Lamini

**Genero** Lama

**Especie** *L. guanicoe* (Müller, 1776)

**Especie** *L. glama* (Linnaeus, 1758)

**Genero** Vicugna

**Especie** *V. vicugna* (Molina, 1782)

**Especie** *V. pacos*

Para la clasificación de la alpaca, aún no está claro si pertenece al género *Vicugna* o *Lama*. Para Linnaeus (1758), pertenece al género *Lama*. Kadwell et al. (2001), sugiere hacer el cambio del género *Lama* a *Vicugna*. Gentry et al. (2004), lo describe como *Vicugna pacos*, la forma domesticada de *Vicugna vicugna*. Por lo tanto, este estudio usará la nomenclatura descrita por J. Wheeler (2005; 2012) y Marin et al. (2007) donde se clasifica como *Vicugna pacos* corroborando los estudios previos de Kadwell y Gentry.

### 2.1.2 Origen y evolución

Los camélidos aparecen en el eoceno tardío y fueron unas de las primeras familias de artiodáctilos modernos. Los camélidos, tanto los de Sudamérica como los de Asia/África se originaron en la parte central de Norte América, donde pasaron más de 40 millones de años de su historia evolutiva y su dispersión a otros continentes ocurrió hace solo 2-3 millones de años (De Lamo, 2011).

El camello primitivo (*Protylopus petersoni*) tenía solo 30 cm de altura en la cruz, dando el aspecto de una miniatura del guanaco actual, pero con mayor contextura muscular, cuatro dedos en cada una de sus patas y 44 piezas dentarias sin separación. Un descendiente de *Protylopus* fue el denominado camello ancestral o *Poebrotherium wilsoni* del oligoceno medio (25–30 millones de años) que tenía el aspecto de un guanaco pequeño, altura semejante al de una oveja moderna, dos dedos en cada pata y dientes con separaciones entre los incisivos y caninos. Esta descendencia presentaba patas largas, cuello alargado y un muy buen desarrollo muscular (De Lamo, 2011).

Durante el mioceno los camélidos mostraron un claro desarrollo en relación a la locomoción; los desplazamientos eran rápidos usando pasos largos, lo que aparece como una adaptación a ambientes amplios y planos (Franklin, 1982).

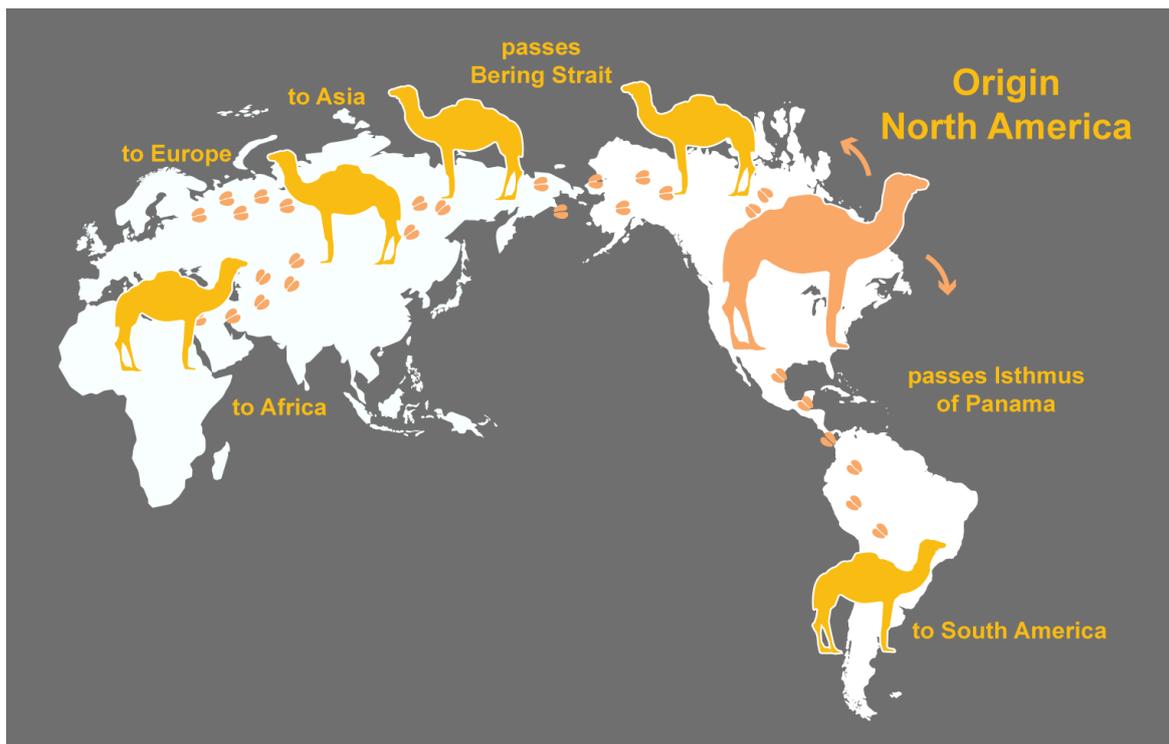
La evolución en Norte América produjo dos grandes grupos de camélidos mucho más avanzados: *Plianchenia* y *Hemiauchenia*. En el mioceno tardío (5-10 millones de años) el género *Plianchenia* evolucionó hacia una forma que exhibía características muy parecidas a la de la llama actual. En el plioceno tardío (3 millones de años) los camélidos emigraron a Asia por el puente terrestre de Beringia. Cuando llegaron a Europa se dispersaron rápidamente por Eurasia, llegando hacia el sur a la zona del Mediterráneo y hacia el este, a través del desierto de Gobi, a China (De Lamo, 2011).

Estos camellos del Viejo Mundo se diferenciaron en las dos especies vivas actuales del género *Camelus*. Ya en el pleistoceno, aparecieron los camellos modernos, el de dos jorobas o bactriano (*Camelus bactrianus*) en las estepas y montañas de Mongolia y el camello dromedario o arábigo (*Camelus dromedarius*) del sudoeste de Asia y el norte de los desiertos africanos (Gauthier-Pilthers y Dagg, 1981). Aunque estudios moleculares han elucidado que la aparición de *Camelus bactrianus* se debió a la domesticación de *Camelus ferus*, siendo este el primero en aparecer junto a *Camelus dromedarius* (Gentry et al., 2004; Burger, 2016).

En América de Norte durante el pleistoceno, *Hemiauchenia* migraba con la apertura del puente de Panamá para colonizar Sudamérica en conjunto con otras especies lo que se denominó como “el gran intercambio americano” (Marshall et al., 1982).

En Sudamérica durante el pleistoceno, se pensaba que *Paleolama* era el ancestro común de los géneros *Lama* y *Vicugna*, pero se determinó que estos últimos pertenecían a la línea evolutiva de *Hemiauchenia*. Hasta final del pleistoceno solo subsistieron los géneros *Lama* y *Vicugna*, dando lugar a los camélidos modernos (Wheeler, 1991; Wheeler, 1995).

Hasta el año 1800, la alpaca, la llama, el guanaco, la vicuña, el dromedario y el bactriano se clasificaron en el mismo género *Camelus*, reflejando una ascendencia común. Posteriormente, la alpaca, la llama, el guanaco y la vicuña fueron removidos del género *Camelus* y colocados en el género *Lama* y *Vicugna*. (Wheeler, 2005)

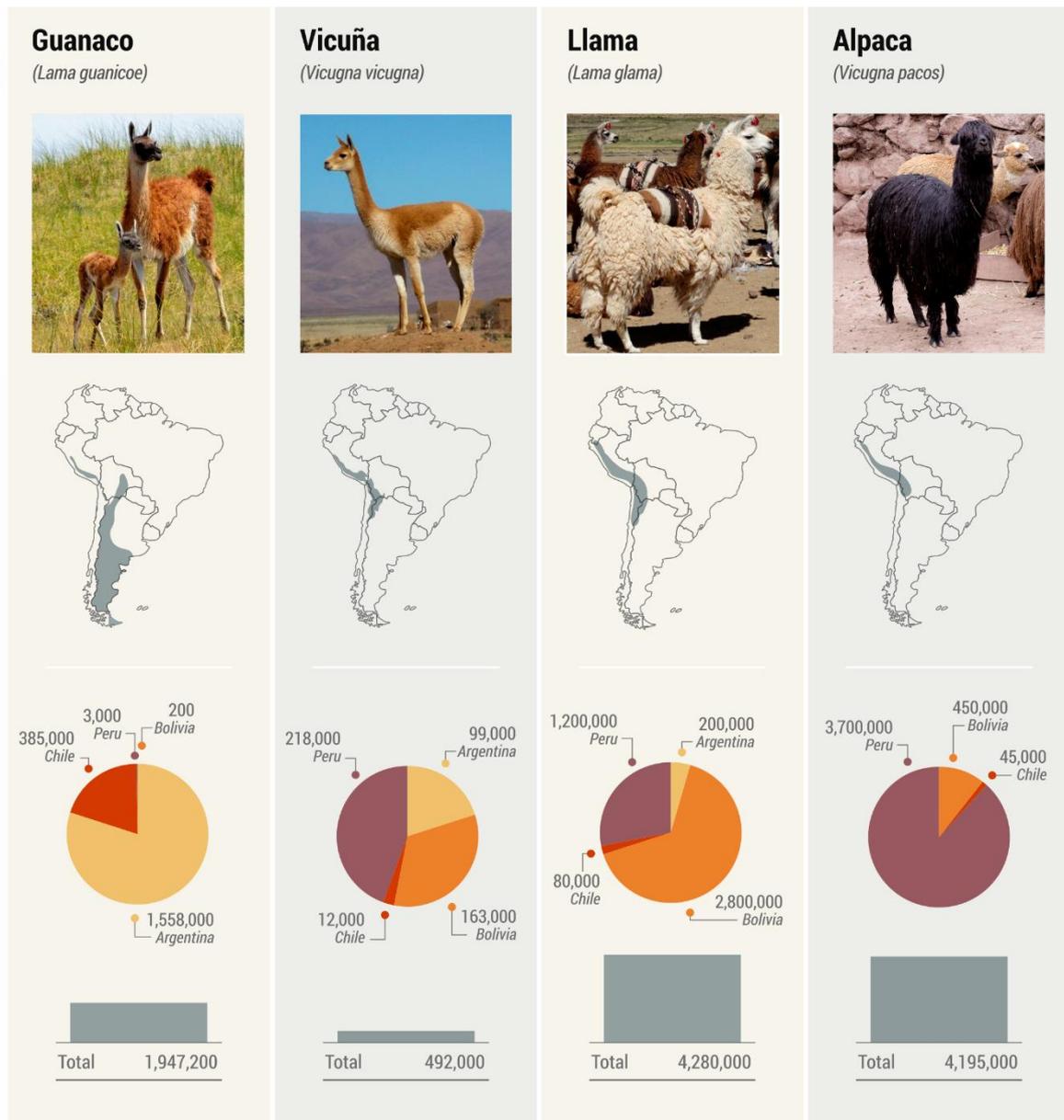


**Figura 1.** Origen y distribución ancestral de los camélidos. Tomado de “Origin and current distribution of camelids” por A. Ross, 2020, *Museum of Natural History of Sweden*.

### 2.1.3 Distribución geográfica

Flores (2008) reporto una población de camélidos en América del Sur en unos 8.1 millones de ejemplares, de los cuales 46.5% son llamas, 43.2% alpacas, 7.5% guanacos y 2.8% vicuña. También que el 53.7% de todos los camélidos sudamericanos se encuentra en Perú, teniendo la mayor cantidad de alpacas y vicuñas. Fuera de Sudamérica se estima un total de 234.840 ejemplares entre USA, Canadá, Australia y Nueva Zelanda.

Estudios reciente de Vilá & Arzamendia (2020) indican una población aproximada de camélidos en América del sur en unos 10.9 millones.



**Figura 2.** Distribución geográfica y poblacional de las especies de camélidos en América del sur. Adaptado de “South American Camelids: their values and contributions to people” por B.Vilá & Y. Arzamendia, 2020, *Sustainability Science*.

#### 2.1.4 Domesticación

La domesticación es una transición continua la cual promueve abundantes polimorfismos morfológicos en animales en relación con sus antepasados silvestres. Dichos atributos difieren según la especie, los genes y su interacción con el medio ambiente para producir los caracteres seleccionables. Esto se ve reflejado a nivel molecular como una "huella de selección artificial y demografía" en los loci de destino de domesticación.(Driscoll et al., 2009; Li et al., 2010).

Con la aparición de las primeras sociedades-estado, la domesticación de camélidos fue la principal actividad ganadera que se desarrolló, sobre todo para aquellas civilizaciones que surgieron en la región del altiplano peruano-boliviano, tal como las sociedades Pucara y Tiwanaku (Lumbreras et al., 1978). El objetivo probable en sus inicios fue el almacenamiento de comida para prevenir tiempos de necesidad (Hesse, 1982; Wheeler, 1984).

La domesticación de la llama y alpaca data de hace unos 6 a 7 mil años, esta información se basa fundamentalmente en cambios observados en la curva de supervivencia y el aumento en la ocurrencia de restos de camélidos sudamericanos en las colecciones óseas arqueológicas (Wheeler, 1991). Sin embargo el auge de su crianza y aprovechamiento se alcanzó durante el imperio incaico del Tawantinsuyo, en el cual la ganadería de llamas y alpacas era una actividad regulada y también llevada a cabo por el Estado (Rostworowski, 1988; FAO, 2005). La perfección de la crianza y selección de alpacas productoras de fibra se dio 4.500 años después del inicio de su proceso de domesticación (Wheeler, 1991).

## **2.2 Selección artificial**

La selección artificial es el proceso por el cual se busca aumentar la frecuencia de rasgos deseables en una población de plantas o animales (Freeman y Herron, 2014).

Para Calle (1984), durante el periodo incaico, la crianza de alpaca y de llamas tuvo tendencia para la preservación y perpetuación de estas especies. Después le dieron importancia en fibra para sus grandes textiles en el caso de alpacas y musculatura para el transporte de materiales para el caso de la llama. Durante la época colonial alrededor de los años 1500, los españoles le dieron mayor importancia a la crianza de llamas para el transporte de minerales de los andes hacia la costa, mientras que la crianza de alpacas decayó en esta época. Cuando aparecieron los vehículos motorizados, la crianza de llamas decayó y regreso el auge de la crianza de alpacas con el fin de buscar cada vez una calidad de fibra más fina como la de vicuña.

Los criadores buscan tener una línea pura (aquella que implico la selección y reproducción de la progenie de organismos superiores durante varias generaciones hasta que se haya establecido una progenie con solo las características deseadas y que estas sigan siendo transmitibles a su descendencia sin sufrir alteraciones) de interés económico para ellos. Esta

selección sin embargo conlleva problemas en características las cuales no se esperaba, como en el caso de caninos domésticos con pedigrí donde las enfermedades hereditarias son un problema del cual se busca reducir la frecuencia de genes no deseados pero manteniendo el pedigrí (Farrell et al., 2015). En ganado vacuno también se evidencio que la raza de línea pura Hereford presentaba una longevidad más baja que la progenie del cruce entre Hereford y una raza “sintética” (Arthur et al., 1993). Ratones seleccionados por su característica de buenos corredores, presentaron sensibilidad al fármaco ritalín, a diferencia de ratones control sin selección alguna (Rhodes et al., 2003).

Li et al. (2010), evidencio un menor número de polimorfismos en la secuencia del gen *mc1r*, gen clave en la pigmentación del pelaje, en cerdos domesticados en comparación con su antepasado silvestre.

En investigaciones en poblaciones de cerdos, el jabalí mostró la mayor variabilidad en su secuencia genética *TLR5* en comparación con las poblaciones comerciales de Occidente. Lo que es consistente con el supuesto común de que la variabilidad genética disminuye como resultado del mejoramiento selectivo (Yang et al., 2013).

Magalhães et al. (2015), concluye que existe una baja diversidad en la región DQA del gen *mch* de clase II en conejos domésticos en comparación con sus parientes silvestres.

Según Abrantes et al. (2013), habían diferencias en la variabilidad del gen *TLR3* en las poblaciones de conejo silvestre y sus razas domésticas, en donde la población silvestre presentaba un mayor número de polimorfismos.

Casos positivos también pueden encontrarse en animales seleccionados. En el ganado vacuno, algunos autores como Mariotti et al. (2009), Zhang et al. (2009), y Sharma et al. (2006) buscaron polimorfismos en los genes *TLR2* y *TLR4* y evaluaron la posibilidad de que estos cambios conferirían resistencia a enfermedades en el ganado vacuno. Además, Bishop et al. (2010) reporta investigaciones sobre polimorfismos que si están relacionados con la resistencia a enfermedades en animales de granja, tales como polimorfismos en los genes *TLR2* y *TLR4* en ovejas para resistencia a la mastitis o polimorfismos en el gen *TLR4* de pollos para resistencia a *Salmonella*. Xu et al. (2008) encontró que en la crianza de *Paralichthys olivaceus*, existen polimorfismos en el gen *mch* clase II, que confieren tanto resistencia como susceptibilidad a la bacteria *Vibrio anguillarum*.

### **2.3 Sistema inmune**

El sistema inmune es aquel en donde participan todas aquellas células y moléculas responsables, cuya reacción conjunta y coordinada responden frente a la entrada de los componentes de los microorganismos, macromoléculas (como proteínas y polisacáridos) y a pequeños compuestos químicos que sean reconocidos como ajenos (Abbas et al., 2012). El sistema inmune se divide en dos partes determinadas por la velocidad y la especificidad de la reacción conocidas como la respuesta innata y la respuesta adaptativa (Parkin y Cohen, 2001; Abbas et al., 2012).

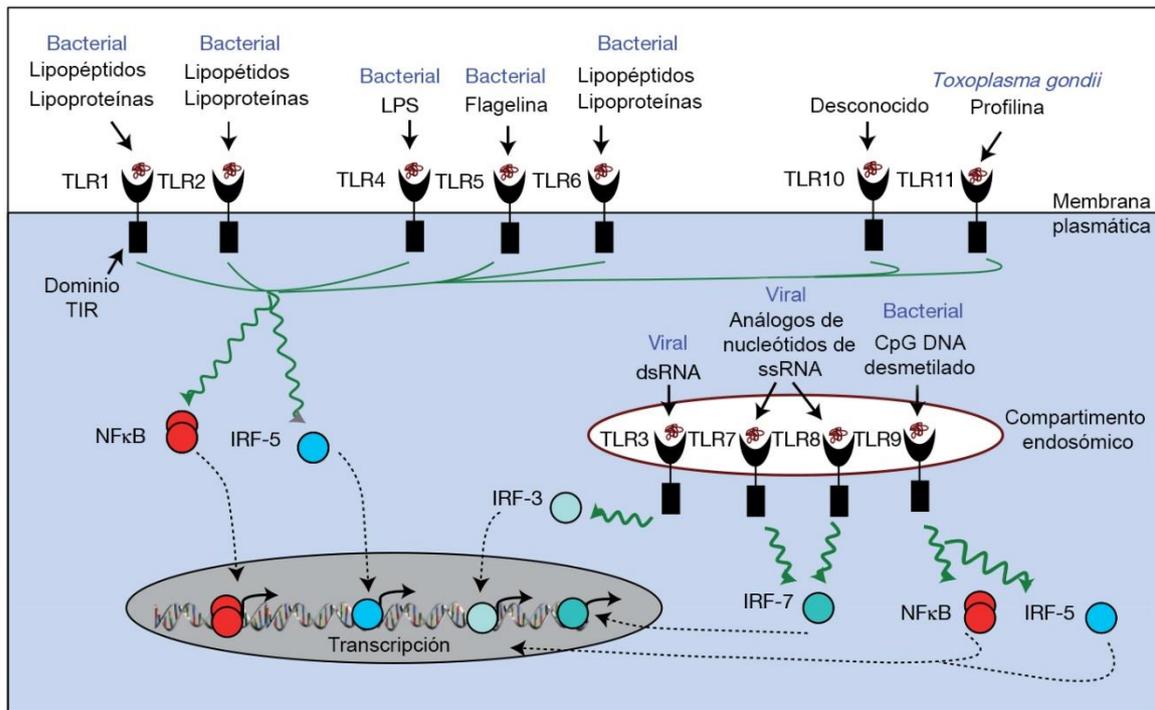
La respuesta inmune innata es la primera línea de defensa contra las infecciones microbianas, y es un sistema conservado entre invertebrados y vertebrados (Parkin y Cohen, 2001; Takeda y Akira, 2001). Tiene como objetivo el reconocimiento de los patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) de microorganismos. Las principales estructuras de reconocimiento que más destacan son las proteínas TLR (*Toll like Receptor*) encargadas del reconocimiento de patógenos y la subsecuente activación del sistema inmune innato (Takeda y Akira, 2001; Uematsu y Akira, 2006).

La inmunidad adaptativa es el sello distintivo del sistema inmune de los animales superiores y es la segunda línea de defensa contra patógenos (Parkin y Cohen, 2001). Esta respuesta consiste en reacciones específicas del antígeno a través de linfocitos T y linfocitos B, es precisa, pero toma varios días o semanas para desarrollarse (Takeda y Akira, 2001). La respuesta adaptativa tiene memoria, de modo que la exposición posterior conduce a una respuesta más vigorosa y rápida (Abbas et al., 2012).

### **2.4 Receptores de tipo toll (TLR's)**

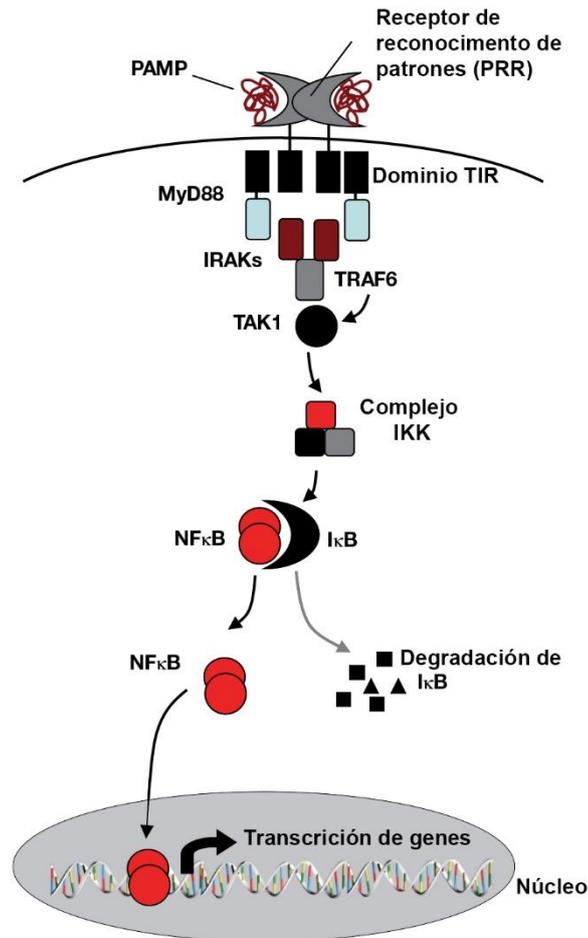
Los receptores tipo *toll*, son una familia de receptores trans-membranales de reconocimiento del patrón del sistema inmunitario. Son expresados en la superficie y en endosomas de muchos tipos celulares, que reconocen estructuras microbianas como la endotoxina y el RNA vírico. Posteriormente, desencadenan la activación de vías para la expresión de genes inflamatorios y antivíricos de transducción de la señal. Están conformadas por una región extracelular rica en leucinas, flanqueadas por estructuras ricas en cisteínas y una región citoplasmática llamado dominio TIR. Los TLR trabajan de manera conjunta ya sea formado dímeros entre sí o juntamente con otros (heterodímeros). También induce la maduración de

las células dendríticas y a la producción de citoquinas, dando como resultado el desarrollo de inmunidad adaptativa (Uematsu y Akira, 2006; Abbas et al., 2012; Delves et al., 2017)



**Figura 3.** Familia de receptores tipo toll (TLR) y los diferentes patrones moleculares asociados a patógenos que activan a los factores de transcripción. Adaptado de “Roitt’s Essential Immunology 13 ed” por D. Burton, P. Delves, S. Martin & I. Roitt, 2017.

Los TLR transducen señales en la célula a través de sus dominios TIR, que reclutan proteínas adaptadoras dentro del citoplasma (como MyD88) que poseen motivos TIR similares. Estos adaptadores propagan la señal en sentido descendente, culminando en la activación de los factores de transcripción NFκB y la familia reguladora del interferón (IRF). La transcripción dependiente de NFκB se da por la activación del complejo de quinasas IκB (IKK). En conjunto, estas proteínas activan el complejo IKK, que a su vez fosforila el inhibidor de NFκB (IκB). La fosforilación de IκB se dirige a este último para su degradación, liberando a NFκB que luego puede translocarse al núcleo e iniciar la transcripción de múltiples genes. (Abbas et al., 2012; Owen et al., 2013; Delves et al., 2017).



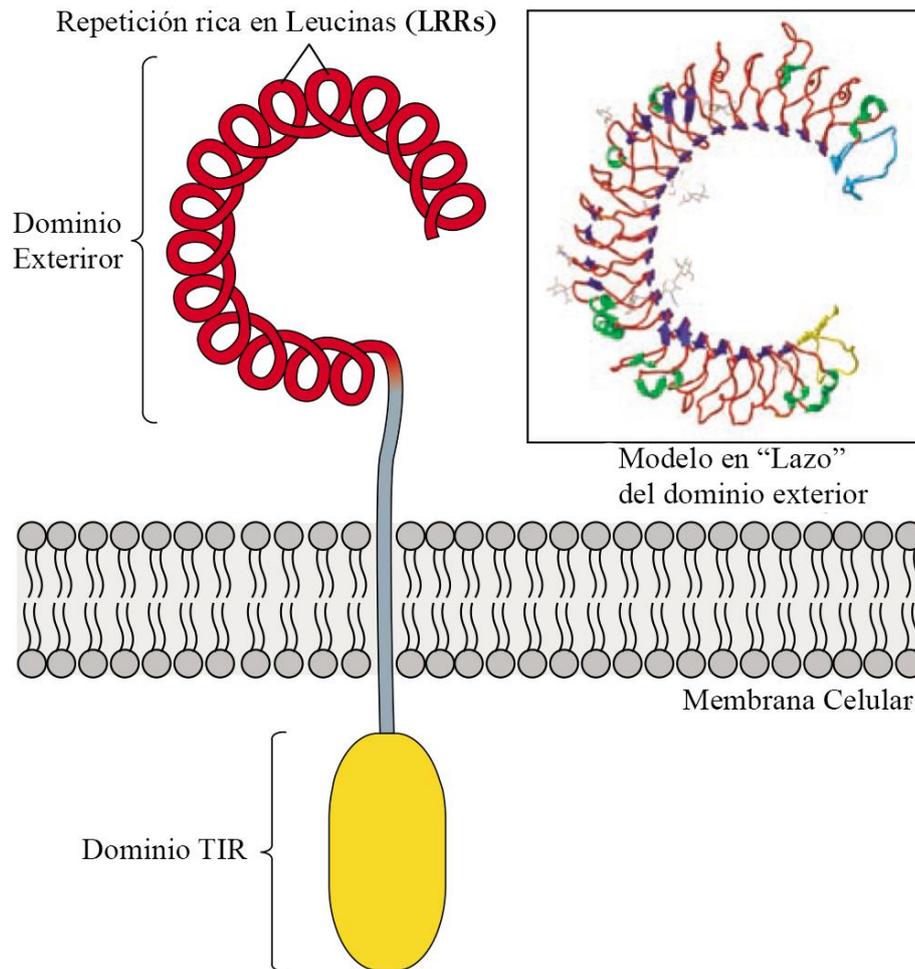
**Figura 4.** Esquema general de la cascada de señalización cuando el PAMP se une al TLR. Adaptado de “Roitt’s Essential Immunology 13 ed” por D. Burton, P. Delves, S. Martin & I. Roitt, 2017.

#### 2.4.1 Repeticiones ricas en Leucinas (LRR)

Las repeticiones ricas en leucina (LRR) consisten en 2-45 motivos de 20-30 aminoácidos de longitud (Enkhbayar et al., 2003). Las LRR crean un andamio proteico en forma de herradura que es adaptable para la unión y el reconocimiento de ligandos en las superficies externa (convexa) e interna (cóncava) (Murphy et al., 2017). Las leucinas miran hacia el interior de la proteína, formando un núcleo hidrófobo que actúa para estabilizar la estructura general de la proteína, con regiones variables hacia afuera para formar una hoja-β. Tal disposición le da a los TLR una forma clásica similar a un solenoide (Delves et al., 2017).

Los LRR se encuentran en proteínas que van desde virus hasta eucariotas, y parecen proporcionar un marco estructural para la formación de interacciones proteína-proteína (Kobe & Kajava, 2001). Las proteínas que contienen LRR incluyen receptores de tirosina

quinasa, moléculas de adhesión celular, factores de virulencia y una matriz de glucoproteínas de unión extracelular. Están involucradas en una variedad de procesos biológicos, incluyendo transducción de señales, adhesión celular, reparación de ADN, recombinación, transcripción, procesamiento de ARN, resistencia a enfermedades, apoptosis y la respuesta inmune (Rothberg et al., 1990; Ng & Xavier, 2011)



**Figura 5.** Estructura de una cadena polipeptídica del TLR. Cada cadena de polipéptido TLR está formada por un dominio exterior de unión al ligando (LRR, que contiene la secuencia LxxLxLxx, donde L es leucina y x cualquier aminoácido), un dominio que atraviesa la membrana y un dominio interior (TIR). Adaptado de "Janeway's Immunobiology 9ed" por K. Murphy, et al., 2017.

#### 2.4.2 *TLR2*

El gen *TLR2* codifica un receptor proteico capaz de detectar una variedad de patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) asociados con bacterias gram-positivas o gram-negativas, micobacterias, hongos, virus y parásitos. Reconoce varios componentes microbianos, tales como lipoproteínas y peptidoglucanos de bacterias gram-positivas y gram-negativas, ácido lipoteicoico de bacterias gram-positivas. También se informa que participa en el reconocimiento de lipopolisacáridos atípicos; estructuras diferentes de los lipopolisacárido típicos de bacterias gram-negativas (Takeuchi et al., 1999; Uematsu y Akira, 2006; Mariotti et al., 2009; Zhang et al., 2009).

#### 2.4.3 *TLR4*

El receptor *Toll-like 4*; sintetizado por el gen *TLR4*, reconoce específicamente el lipopolisacárido bacteriano (LPS) junto con varios otros componentes de patógenos, moléculas endógenas y endotoxinas asociadas con bacterias Gram negativas, lo que conduce a la iniciación de vías de señalización de células posteriores y la activación de respuestas inmunes innatas y adaptativas (Vaure y Liu, 2014; Behl et al., 2014).

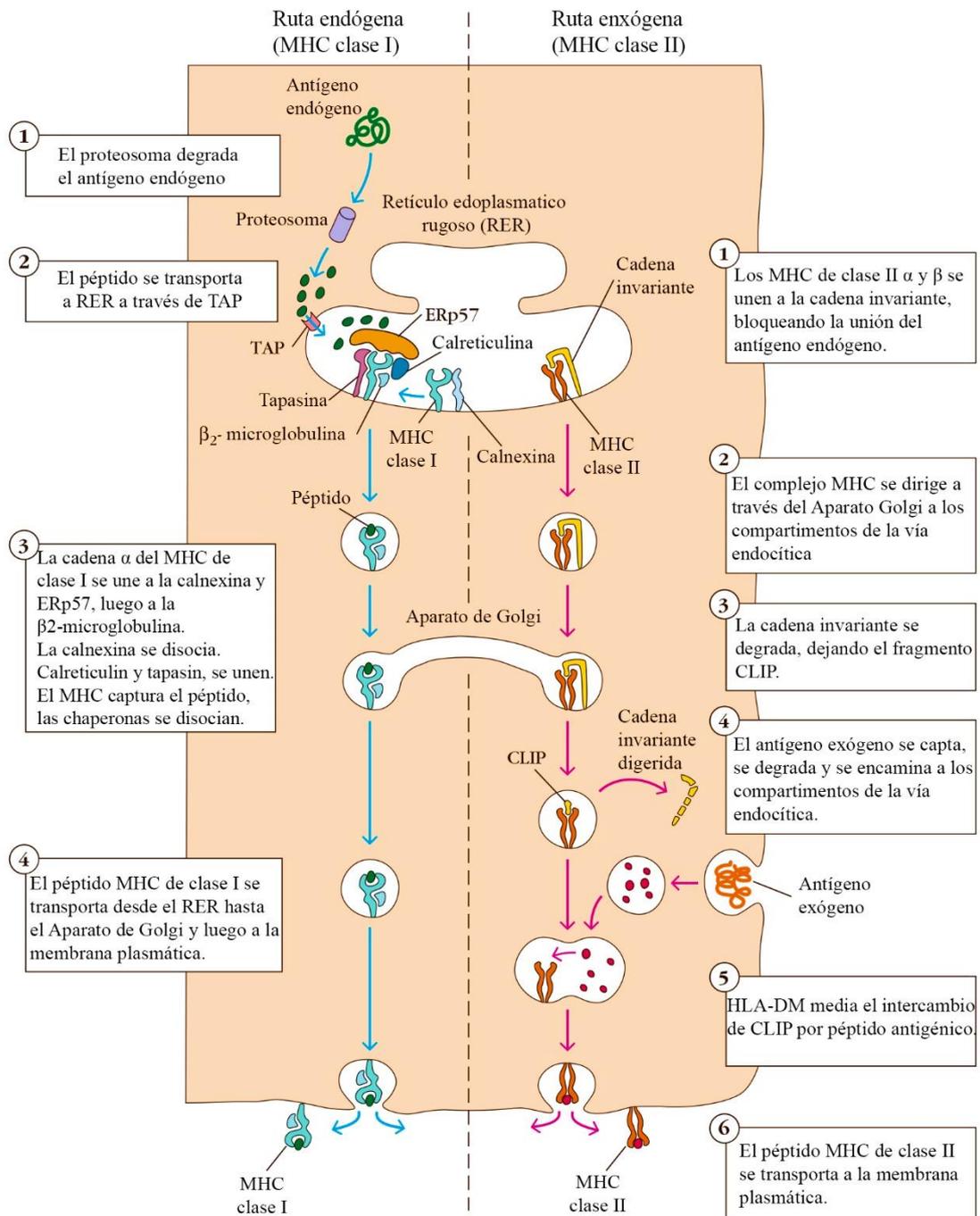
### 2.5 Complejo Mayor de Histocompatibilidad (MHC)

El complejo MHC es una región genómica que comprende genes muy polimórficos los cuales codifican moléculas de anclaje de péptidos reconocidas por los linfocitos T. Desempeñan un papel crucial en las interacciones del hospedador y del patógeno (Abbas et al., 2012; Plasil et al., 2016). Los polimorfismos en MHC parecen haber sido fuertemente seleccionados por presiones evolutivas. Esto probablemente ha surgido a través de la selección dirigida por patógenos para formar nuevos alelos que puedan ofrecer una mayor "aptitud" para el individuo contra ellos. Estos polimorfismos pueden ser de sustituciones por reemplazo (cambian un aminoácido) o sustituciones silenciosas (cambian el codón, pero dejan el aminoácido igual). Las sustituciones de reemplazo ocurren con una frecuencia más alta en relación con las sustituciones silenciosas. (Delves et al., 2017; Murphy et al., 2017).

Hay dos maneras en las que el péptido del antígeno puede unirse al MHC. El antígeno puede haber sido producido endógenamente dentro de la célula, y estos son anclados con el MHC de clase I a través de vías de procesamiento intracelular. El antígeno exógeno se procesa a

través de una vía diferente, y se anclan también intracelularmente a las moléculas MHC de clase II (Parkin y Cohen, 2001). Las moléculas del MHC de clase III, son un grupo de proteínas no relacionadas que no comparten similitud estructural o función con las moléculas de clase I y II, aunque muchas de ellas participan en otros aspectos de la respuesta inmunitaria (Owen et al., 2013). Por lo tanto las moléculas codificadas por MHC que se anclan al antígeno, están directamente implicadas en interacciones moleculares con péptidos específicos derivados de patógenos a los que está expuesta una población (Plasil et al., 2016).

Los genes que componen al sistema MHC de clase I y II, son los más polimórficos del genoma humano. Para algunos de estos genes se han identificado más de 600 variantes alélicas. Sin embargo, cabe exceptuar la región genética DRA dentro del sistema MHC ya que dicha secuencia genómica no varía entre distintos individuos por lo que se dice que son monomórficas (Delves et al., 2017).



**Figura 6.** Vías de presentación de antígenos endógenos (izquierda) y exógenos (derecha) por el complejo MHC. Adaptado de "KUBY Immunology 7 ed" por P. Jones, J. Owen, J. Punt, & S. Stranford, 2013.

## 2.6 Cebadores

Un cebador es una secuencia corta de ADN monocatenario necesario para la replicación del ADN debido a que las enzimas que catalizan este proceso (ADN polimerasas) solo pueden agregar nuevos nucleótidos a un fragmento existente de ADN. Es utilizado en la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en donde se utiliza un par de cebadores que se hibridan con un ADN molde para definir la región a amplificar (NIH, 2022).

### 2.6.1 Diseño de cebadores

Un buen cebador es aquel que amplifican específicamente la región de interés en el genoma y el investigador debe tener en cuenta ciertos criterios básicos para su elaboración (Beyene, 2014)

Como primer criterio esta la especificidad donde se toman en cuenta dos puntos críticos: a) Los cebadores deben ser complementarios a las secuencias que flanquean a la región diana y b) los cebadores no deben ser complementarios a otras zonas genómicas que no sean las requeridas (Beyene, 2014).

El segundo criterio para tomar en cuenta es el tamaño del cebador. Un rango ideal de los oligonucleótidos puede estar comprendido entre 18-24 nucleótidos (Beyene, 2014). La longitud del cebador determina la temperatura de *annealing* y preferiblemente se excluyen aquellas que muestran una temperatura inferior a 50°C (Chen et al., 2003). Cebadores cortos de entre 8-10 pb presentan temperaturas de *annealing* relativamente bajas (36-40°C) (Liu & Cordes, 2004).

El tercer criterio es la temperatura de fusión ( $T_m$ ). Es aquella temperatura a la que la mitad de un ADN bicatenario particular se disociará y se convertirá en ADN monocatenario. La estabilidad de un dúplex de ADN cebador-molde se puede medir mediante su  $T_m$  y aquellos cebadores que presenten un  $T_m$  entre 52-60°C generalmente presentaran mejores resultados (Beyene, 2014). Cabe mencionar que entre cada par de cebadores, el  $T_m$  solo puede tener una diferencia máxima de 5°C (Chen et al., 2003).

Como cuarto criterio está el tamaño del amplicon. La Taq polimerasa amplifica fácilmente una longitud de fragmento en un rango de 1000 bp a 2000 bp, agregando 1000 bp por minuto. Para una PCR estándar, los cebadores deben ser complementarios a las regiones del ADN diana con una separación de 1000 pb entre sí (Beyene, 2014).

El quinto criterio son los dímeros de cebadores. La cual consta de cebadores que se han unido (hibridado) entre sí debido a bases complementarias en los mismos. En consecuencia, la ADN polimerasa amplifica los dímeros, conduciendo a la competencia por los reactivos de PCR (Beyene, 2014). Hay dos tipos de dímeros intermoleculares: el *self-dimer*, formado por cebadores que se hibridan consigo mismo, y el *hetero-dimer*, formado por los cebadores forward y reverse que hibridan entre sí (Beyene, 2014; Pala, 2019). Para evitar la formación de dímeros, se evalúa la energía libre de Gibbs ( $\Delta G$ ) ya que la estabilidad de unión se mide mediante este parámetro y cuanto menor sea la  $\Delta G$ , más estable es el dímero (Qu & Chenggang, 2015). La  $\Delta G$  también es usada para evaluar el *hairpin-loop* (una estructura secundaria) ya que esta se forma debido a la doblez que realiza el extremo 3' de un cebador cuando se une con sus propias bases (Chen et al., 2003). Generalmente, valores para el  $\Delta G \geq -6.0 \text{Kcal/mol}$  son aceptables (Pala, 2019) aunque algunos autores como Kim et al. (2016) consideran validos valores  $\Delta G \geq -9.0 \text{Kcal/mol}$ .

Como último punto está la evaluación del contenido G/C dentro de los cebadores. Un buen contenido G/C dentro del cebador oscila entre el 40-60%, lo que garantiza una unión estable entre el cebador y el ADN molde (Beyene, 2014; Buck et al., 1999). Un alto contenido G/C dentro de los cebadores asegura una mayor estabilidad a su unión con al ADN molde, pero a su vez disminuye el  $\Delta G$  (Qu & Chenggang, 2015).

Para (Chen et al., 2003), otro criterio también para tomar en cuenta es la baja complejidad en el cebador durante su elaboración. Debido a que reducirá su poder de discriminación dentro del genoma y por ende reducirá su especificidad. Normalmente, se excluyen cuatro o más nucleótidos continuos, como AAAA, TTTT, CCCC o GGGG tanto para el cebador forward como reverse. También se evitan las repeticiones continuas de nucleótidos tales como: "ATATAT", "GCGCGC", etc.

## **2.7 Diversidad genética**

Es la variación de alelos y genotipos presentes en una población la cual proporciona una base para los procesos adaptativos y evolutivos (Sheriff & Alemayehu, 2018). La diversidad genética surge principalmente como variantes en la secuencia de nucleótidos en el ADN. Las mutaciones pueden ocurrir en la región codificante de los genes, en las regiones espaciadoras dentro y entre los genes, en el número de copias de genes, en la relación de ligamiento entre varios genes o incluso en cromosomas completos. Una pequeña parte de estos cambios se

traduce en variación de proteínas, en polimorfismos de marcadores o en variaciones de caracteres fisiológicos o morfológicos (Brown, 2008).

La diversidad genética en los animales de granja es necesaria para satisfacer las necesidades de producción actuales en diversos entornos. Permite un mejoramiento genético sostenido facilitando una rápida adaptación de aquellos caracteres seleccionados durante la crianza (Notter, 1999).

La diversidad genética es estimada mediante el cálculo de parámetros o índices que cuantifican la variación genética (polimorfismos) y resumen dicha información en términos numéricos mucho más manejables (Barahona Padilla, 2014).

## **2.8 Red y estimación de haplotipos**

La construcción de redes de haplotipos es un enfoque ampliamente utilizado para analizar datos genéticos y visualizar, dentro de una población o especie, relaciones genealógicas a nivel intraespecífico. Es una herramienta que nos ayuda a realizar inferencias sobre la biogeografía y la historia de las poblaciones (Leigh & Bryant, 2015; Paradis, 2018).

Las redes permiten distinguir patrones demográficos, flujo genético, cuello de botella genético o un probable efecto fundador en las poblaciones. También es empleado para evaluar eventos como hibridación, transferencia genética horizontal o recombinación (Pajares Chirre, 2018; Villanueva Cáceda, 2018).

La estimación de haplotipos es cada vez más importante a medida que entramos en la era de la secuenciación a gran escala. Debido a que las secuencias y datos de polimorfismos generalmente toman la forma de genotipos no estimados, no se observa directamente en cuál de los dos cromosomas parentales (o haplotipos) se encuentra un alelo particular. Afortunadamente, los nuevos avances en los métodos computacionales y de laboratorio prometen una mejor determinación en la estimación de los haplotipos. Estos métodos pueden ayudar en la detección de mutaciones recurrentes dentro de una secuencia (Browning & Browning, 2011; Kong et al., 2008)

En la actualidad, uno de los métodos de reconstrucción de haplotipos más utilizados se implementa en el software *PHASE*. Este enfoque bayesiano emplea los tiempos de coalescencia entre un haplotipo dado y el haplotipo de plantilla subyacente. Además, utiliza el método de Monte Carlo basado en cadenas de Markov permitiendo explorar el espacio de

todas las soluciones posibles. *PHASE* es adecuado para cantidades moderadamente pequeñas de marcadores (hasta 100) y tamaños de muestrales pequeños (hasta varios cientos de individuos) (Browning & Browning, 2011; Garrick et al., 2010; Marchini et al., 2006).

La mayor desventaja del programa *PHASE* es la transformación en un código numérico antes de ejecutar el programa, y los resultados deben transformarse nuevamente a la nomenclatura nucleotídica original. Por lo tanto, la transformación de datos puede resultar muy laboriosa con grandes conjuntos de datos (Bettencourt et al., 2008). También, que a pesar de tener un umbral de confianza mayor al 90% y generar muy pocos falsos positivos, la mayoría de los genotipos cuyo alelo solo se presentaban una vez no pudieron resolverse (Garrick et al., 2010). Tishkoff et al. (2000) recalca que en aplicaciones donde los haplotipos raros son informativos, los enfoques computacionales por sí solos pueden ser inadecuados.

Bettencourt et al. (2008), concluye que el uso del software *PHASE* v2.1.1 tuvo el mejor rendimiento general tanto en la construcción de haplotipos como en el cálculo de su frecuencia. Su investigación fue el primer trabajo destinado a probar métodos estadísticos utilizando 122 haplotipos de HLA (A-B-Cw-DQB1-DRB1); determinado mediante recuento directo, y comparándolos con haplotipos obtenidos mediante programas de estimación haplotípica. Marchini et al. (2006) también demuestra que el algoritmo del programa *PHASE* es el más preciso para la estimación de haplotipos.

Al igual que con otros genes y tamaños de muestra, se comprueba que los métodos computacionales pueden proporcionar un cálculo eficaz de las frecuencias de haplotipos mediante el uso de datos de individuos no relacionados (Fallin & Schork, 2000; Zhang et al., 2001; Xu et al., 2002; Avery et al., 2005; Bettencourt et al., 2008)

La práctica estándar de omitir genotipos no resueltos de los análisis posteriores puede dirigir a reducciones considerables en la diversidad filogenética general que se inclina hacia la pérdida de alelos con divergencias de secuencia por pares mayores que el promedio y, a su vez, esto causa un sesgo sistemático en las estimaciones de parámetros genéticos. (Garrick et al., 2010)

### III. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1 Lugar de muestreo

Se escogieron zonas geográficas en donde la población de camélidos presentaba una mayor densidad poblacional. Para el caso de alpacas y llamas se escogió el centro de investigación en camélidos del INIA ubicado en el anexo Quimsachata de la EEA Illpa. Ubicado entre los distritos de Santa Lucía y Cabanillas de las provincias de Lampa y San Román respectivamente en el departamento de Puno. Está situado entre las coordenadas 15° 04' S y 70° 78' W. Este centro viene realizando trabajos de investigación bajo la dirección del Programa Nacional en Camélidos desde 1988.

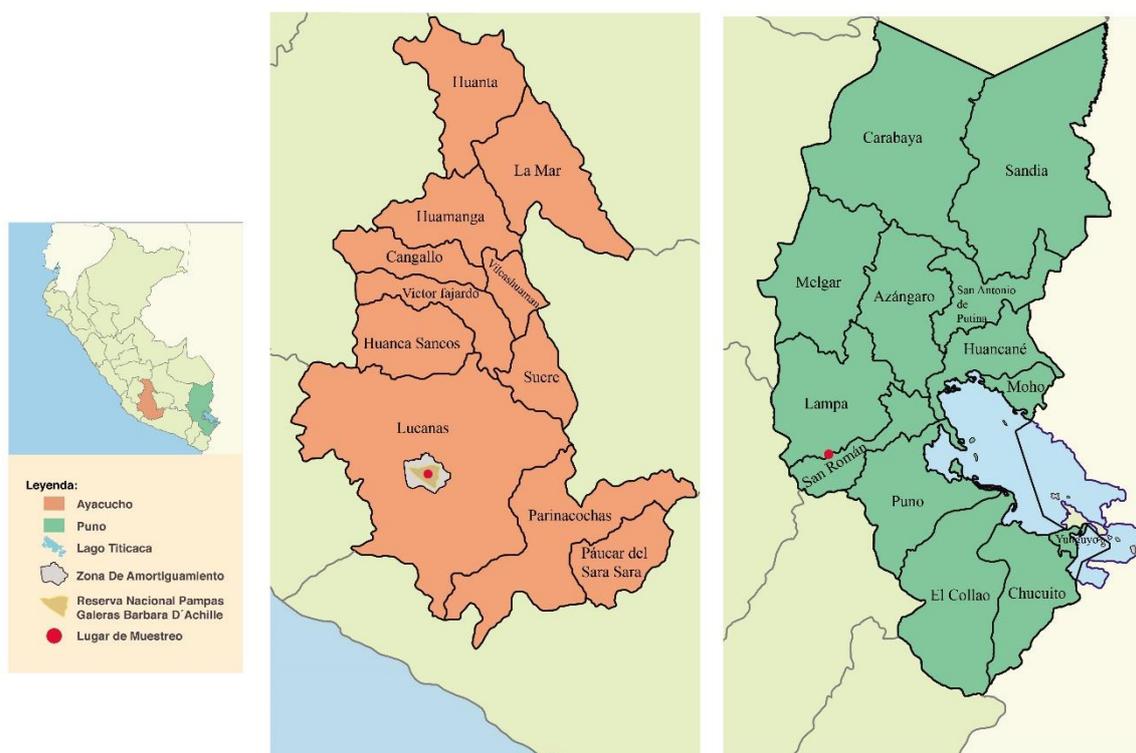


Figura 7. Ubicación de los puntos de muestreo en Ayacucho y Puno.

En vicuñas se escogió La Reserva Nacional Pampa Galeras Bárbara D'Achille, ubicada en la provincia de Lucanas, departamento de Ayacucho y entre las coordenadas 14°41'35'' S y 74°22'08'' W. Esta reserva nacional concentra la mayor población de vicuñas del país y del mundo en un espacio muy reducido.

Se colectaron 30 muestras de alpacas, llamas y vicuñas. Dando en total 90 muestras de camélidos sudamericanos (Anexos 1 y 2). Para este estudio, no se pudo considerar a la población de guanacos.

### 3.2 Toma de muestra

El animal fue inmovilizado sujetándolo del cuello mediante una maniobra tipo ahorque y también de la cola levantándola al mismo tiempo. Se ubicaron los huesos tubérculo ventral caudal y Proceso transversal en las vértebras cervicales VI y VII. En esta zona se encuentran las venas yugulares donde se inserta la aguja *vacutainer* de 21g para la extracción aproximada de 5ml de sangre en tubos *vacutainer* conteniendo EDTA. Como plan de contingencia en caso no poder extraer sangre de la yugular, se postra al animal en el suelo hacia uno de sus costados y se ubica la vena femoral cercana al hueso Fémur en el miembro pélvico y se procede a la extracción.



**Figura 8.** Toma de muestra sanguínea. (Izquierda) toma a partir de la vena yugular. (Derecha) toma a partir de la vena femoral.

### 3.3 Procesamiento de las muestras

Los tubos que contuvieron la sangre fueron almacenados a 4°C esperando a la sedimentación de glóbulos rojos para la visualización de tres fases: Plasma, Glóbulos blancos y Glóbulos rojos. Se colectó 200µl de la interfase, tratando de colectar la mayor cantidad de glóbulos blancos posibles en tubos *ependorf* de 1.5ml. Posteriormente se realizó una serie lavados a la muestra con 500µl de TE 20:5 en una centrifuga a 7500rpm por 3 minutos para poder descartar el exceso de plasma y glóbulos rojos presentes.

### 3.4 Extracción y evaluación de ADN a partir de glóbulos blancos

La metodología empleada para la extracción de ADN fue la de *Salting out* (Aljanabi & Martinez, 1997) con ciertas modificaciones ya establecidas por el Laboratorio de Ecología Molecular y Biodiversidad de la UNMSM. Dicho protocolo se explica a continuación:

1. A cada tubo conteniendo los glóbulos blancos limpios se le adiciono un volumen de TNE:Urea c.s.p 250 µl, 50µl de SDS 10% (concentración final 2%) y 5µl de Proteinasa K 20mg/ml. Se homogeneizo por inversión cada tubo para que cada reactivo pueda actuar de mejor manera y posteriormente se incubo a 60°C por un tiempo de dos horas realizando agitaciones constantes cada cierto lapso.
2. Al término de la lisis, se agregó 15µl de NaCl 5N (concentración final 0.25M), se invirtió el tubo hasta homogenizarlo. El siguiente paso fue agregarle una tercera parte con respecto al volumen de solución con acetato de amonio 10M y repetir el proceso de homogenización. Finalmente se agregó un volumen de Isopropanol helado en proporción 1:1 con respecto al volumen total, se agito por inversión hasta formar una nubosidad y se incubo a -20°C por 30 minutos.
3. Al término de la incubación, las muestras se centrifugan a 7500rpm por 10 minutos debido a la alta concentración de ADN presente en el tubo. Se descartó el sobrenadante y el pellet fue resuspendido en 100µl de TE 20:5 para posteriormente agregarle 5µl de NaCl 5M (concentración final 0.25M) y Etanol absoluto helado en relación 3:1 con respecto al volumen del tubo. Se agito por inversión hasta volver a formar la nubosidad y se centrifugó a 7500rpm por 10 minutos.

4. Se descartó el sobrenadante y el pellet fue lavado 3 veces. El primer lavado con 500µl de Etanol Absoluto (70%): TE20:5(30%). El segundo lavado con 500µl de Etanol Absoluto (70%): TE20:1(30%) y finalmente, el tercer lavado con 500µl de Etanol Absoluto (70%): Agua destilada (30%). En cada lavado el pellet se centrifugo a 13500rpm por 5 minutos y descartando al término de cada lavado el sobrenadante.
5. El pellet resultante se llevó a incubación a 60°C por 30-40 minutos para evaporar la totalidad de etanol presente en la muestra.
6. Una vez terminado el tiempo de incubación, el pellet fue resuspendido en 100µl de TE 20:1

Una vez obtenido el ADN, se procedió a la evaluación de la integridad de este. Para ello, se mezcló 3µl de ADN de cada individuo con 1µl de *Buffer Loading* 6X y se cargó en geles de Agarosa a una concentración del 1%. Las condiciones de la electroforesis fueron 110 V por un tiempo de 30 minutos. La tinción del gel fue en Bromuro de Etidio (5mg/ml), visualizándose en un transiluminador UV.

### **3.5 Cuantificación de ADN**

La cuantificación para determinar la concentración de ADN (ng/µl) y el estado de pureza o relación ADN/Proteína mediante la relación entre la absorbancia a 260nm y la absorbancia a 280nm (A260/A280), se determinó mediante el uso de un espectrofotómetro Nanodrop™ (Thermo Fisher Scientific, Inc).



**Figura 9.** Equipo Nanodrop™ para cuantificación de ADN.

### **3.6 Amplificación de los genes *TLR2* y *TLR4***

#### **3.6.1 Diseño de cebadores**

La búsqueda de los genes se realizó en la base de datos del NCBI (National Center for Biotechnology Information). Los códigos de acceso para los mRNA de los genes *TLR2* y *TLR4* en *Vicugna pacos* fueron XM\_015246997.2 (ubicado en la secuencia genómica NW\_021964157.1) y XM\_006211381.3 (ubicado en la secuencia genómica NW\_021964163.1) respectivamente. Como el mRNA se compone de varios exones, en cada secuencia se identificó a aquel exón que contenían la región codificante del gen de interés. Para el caso del gen *TLR2* su mRNA tenía un único exón por lo fue sencillo ubicar su región codificante. Sin embargo, para el gen *TLR4* su mRNA presentaba 3 exones y cuya región codificante del gen de interés se encontraba en el exón número 3. A continuación, se utilizó la herramienta *blastx* (Zhuang et al., 1997) del NCBI (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) para traducir cada región codificante a proteína e identificar la posición de su dominio extracelular o región rica en leucinas (LRR). La secuencia del gen *TLR2* se amplió 400bp aguas arriba, para poder realizar el diseño de su cebador *forward*.

El proceso se repitió usando a los miembros de la familia Camelidae (*Camelus ferus*, *Camelus dromedarius* y *Camelus bactrianus*) con la finalidad de elaborar cebadores universales. Las secuencias obtenidas fueron descargadas y posteriormente alineadas entre si usando la herramienta *ClustalW* del programa BioEdit v7.2.5 (Hall, 1999) para ver su estado de conservación.

Como secuencia molde para la elaboración de los cebadores se utilizó la secuencia de *Vicugna pacos* para ambos genes debido a su relación directa con todas las especies de camélidos sudamericanos. Se usó la herramienta *OligoAnalyzer* y *PrimerQuest* de IDT (<http://www.idtdna.com/Scitools/Scitools.aspx>) asegurando que los valores de los  $\Delta G$  (kcal/mol) para *hetero-dimer*, *self-dimer* y *hairpin* sean  $\Delta G > -6$  kcal/mol. Además de que cada cebador tuviera una  $T_m = 60^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$  y una proporción G/C entre 45-55%.

Los cebadores candidatos fueron alineados usando la herramienta *ClustalW* del programa BioEdit v7.2.5 (Hall, 1999) con todos los individuos seleccionados con la finalidad de obtener un consenso entre las secuencias (*Clustal consensus*) que difiera en máximo 2 bases por cada cebador.

Cada cebador fue alineado en el genoma de la alpaca (*Vicugna pacos*) utilizando la herramienta *In-Silico* PCR de la Universidad de Santa Cruz de California (<https://genome.ucsc.edu>) para determinar que exista una única zona de unión para cada uno.

**Tabla 1: Secuencia de cebadores usados para la amplificación de la región LRR en los genes *TLR2* y *TLR4* en camélidos**

Cebador	Dirección	Secuencia (5'→3')	Tamaño del amplicon (bp)
V.P TLR2 LRR F	Forward	GCTGTCAAACACAATCACTC	878
V.P TLR2 LRR R	Reverse	CAGTTTCACCAGCTCACTAA	
V.P TLR4 LRR F	Forward	TTCAAGGGTTGCTGTTCTC	615
V.P TLR4 LRR R	Reverse	CAGGAAATGCTGGTGTTC	

### 3.6.2 Amplificación de la región LRR de los genes *TLR2* y *TLR4* mediante PCR

La estandarización de los cebadores para la amplificación de la región rica en leucinas (LRR) de los genes *Toll Like Receptor* se llevó a cabo utilizando la enzima Maximo Taq DNA Polymerase 5U/ $\mu$ l y MgCl<sub>2</sub> 100mM (GeneOn), Fermentas Taq Buffer 10X with KCl (Thermo Fisher Scientific) y dNTPs (Geneaid™) utilizando distintas concentraciones de MgCl<sub>2</sub> (1, 1.5, 2 y 2.5 mM) y rangos de temperatura (50-60°C) y determinar el más óptimo de ellos. Las reacciones de PCR se llevaron a cabo en un termociclador Applied Biosystems Abi 2720 GeneAmp. Las concentraciones finales establecidas para los reactivos y el programa final de amplificación se muestran en las tablas 2 y 3 respectivamente.

Para verificar si la amplificación de los genes se realizó con éxito, los productos de PCR fueron separados mediante electroforesis en un gel de Agarosa al 2.5% junto con un DNA ladder 100bp RTU (GeneDireX). Las condiciones de la electroforesis fueron 110 V por un tiempo de 20 minutos. La tinción del gel se realizó con Bromuro de Etidio (5mg/ml) y revelado en un transiluminador UV.

**Tabla 2: Protocolo de amplificación de la región LRR en los genes *TLR2* y *TLR4***

Reactivo	Concentración inicial	Concentración final	Volumen x Tubo
Agua Estéril			20.325 $\mu$ l
Taq Buffer 10X	10X	1X	2.5 $\mu$ l
MgCl <sub>2</sub>	100 mM	1.5 mM	0.375 $\mu$ l
dNTPs	10 mM	0.08 mM	0.2 $\mu$ l
Cebador Forward	10 $\mu$ M	0.08 $\mu$ M	0.2 $\mu$ l
Cebador Reverse	10 $\mu$ M	0.08 $\mu$ M	0.2 $\mu$ l
Taq DNA Polymerase	5 U/ $\mu$ l	1 U	0.2 $\mu$ l
ADN	100 ng/ $\mu$ l	100 ng	1 $\mu$ l
Volumen final			25 $\mu$ l

**Tabla 3: Programa de amplificación de la región LRR en los genes *TLR2* y *TLR4***

Fase	Ciclos	Temperatura	Tiempo
Desnaturalización inicial	1	95°C	5 minutos
Desnaturalización	35	95°C	30 segundos
Hibridación	35	58°C	30 segundos
Extensión	35	72°C	1 minuto
Extensión final	1	72°C	5 minutos

### **3.7 Amplificación de los genes *DPBI*, *DQBI* y *DRBI* del complejo mayor de histocompatibilidad clase II (MHCII)**

#### 3.7.1 Diseño de cebadores

La búsqueda de estos genes se basó en los genomas de los camélidos del viejo mundo para posteriormente ubicarla en el genoma de alpaca. La búsqueda se realizó en la base de datos del NCBI (National Center for Biotechnology Information). El código de acceso para el gen *DPBI* en *Camelus ferus* fue XM\_032462786.1 ubicado en la secuencia genómica NC\_045715.1. Para los genes *DQBI* y *DRBI* se utilizaron los códigos de acceso de mRNA XM\_010949126.1 y XM\_010949122.1 respectivamente de *Camelus bactrianus* ubicados en la secuencia genómica NW\_011511766.1. La secuencia de los genes *DPBI* de *Camelus ferus* y *DQBI* y *DRBI* de *Camelus bactrianus*, se alinearon en el genoma de *Vicugna pacos* usando el programa *BLAST-genomes* (Zhang et al., 2000) (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) del NCBI para poder extraer las secuencias correspondientes en alpaca. De cada gen del complejo mayor de histocompatibilidad clase II (MHCII) se identificó la región codificante para el exón número 2.

Todas las secuencias molde durante la elaboración de los cebadores fueron sacadas del genoma de *Vicugna pacos*. Se usó la herramienta *OligoAnalyzer* y *PrimerQuest* de IDT (<http://www.idtdna.com/Scitools/Scitools.aspx>) asegurando que los valores de los  $\Delta G$

(kcal/mol) para *hetero-dimer*, *self-dimer* y *hairpin* sean valores  $\Delta G > -6$  kcal/mol. Además, que cada cebador tuviera un  $T_m = 60^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$  y un G/C entre 45-55%.

Los cebadores candidatos fueron alineados usando la herramienta *ClustalW* del programa BioEdit v7.2.5 (Hall, 1999) con los individuos de la familia *Camelidae* con la finalidad de obtener un consenso entre secuencias que difiera en máximo 2 bases por cada cebador ya que, si la diferencia de bases aumenta, la especificidad de unión del cebador con la secuencia molde disminuiría más aún si dicha diferencia se ubica cerca del extremo 3' (Iserte et al., 2013).

Cada cebador fue alineado en el genoma de la alpaca (*Vicugna pacos*) utilizando la herramienta *In-Silico* PCR de la Universidad de Santa Cruz de California (<https://genome.ucsc.edu>) para determinar que exista una única zona de unión para cada uno.

Para la elaboración de estos cebadores, se tomó en cuenta la nomenclatura IUPAC para el sistema de bases degeneradas como se muestra en la Tabla 4

**Tabla 4: Nomenclatura IUPAC para el sistema de bases nucleotídicas degeneradas**

Código	Nucleótidos	Explicación de la denominación*
R	A/G	<b>PuR</b> ine
Y	C/T	<b>PY</b> rimidine
M	A/C	<b>AM</b> ino
K	G/T	<b>K</b> eto
S	C/G	<b>Strong</b> interaction
W	A/T	<b>Weak</b> interaction
H	A/C/T	Not G, <b>H</b> follows G in alphabet
B	C/G/T	Not A, <b>B</b> follows A in alphabet
V	A/C/G	Not T/U, <b>V</b> follows U in alphabet
D	A/G/T	Not C, <b>D</b> follows C in alphabet
N	A/T/G/C	<b>ANy</b>

*Nota:* Adaptado de "The State of Knowledge in Designing Primer of interest for successful Polymerase Chain Reaction: A review" por D. Beyene, 2014. *Advanced Journal of Biological Sciences Research*, 2(1), 1–12

\*Abreviatura del idioma inglés en mayúscula y en negrita, la letra usada en la columna del código.

**Tabla 5: Secuencia de cebadores usados para la amplificación del exón 2 en los genes *DPB1*, *DQB1* y *DRB1* del MHC clase II en camélidos**

Cebador	Dirección	Secuencia (5'→3')	Tamaño del amplicon (bp)
V.P DPB1 F	Forward	CAGGGTCTTCTCTCCTCMA	357
V.P DPB1 R	Reverse	AGAGYGTCTCATGGGTGTT	
V.P DQB1 F	Forward	CGTGATCTCAYRTCTCACTATG	326
V.P DQB1 R	Reverse	TCTCTTACGCCACTCCAC	
V.P DRB1 F	Forward	CTTGTGCTGGTGCTTAGG	598
V.P DRB1 R	Reverse	TGAAGTCACGCAYTGTCTC	

### 3.7.2 Amplificación del exón 2 para los genes *DPB1*, *DQR1* y *DRB1* del MHC clase II mediante PCR

La estandarización de los cebadores para la amplificación de la región rica en leucinas (LRR) de los genes *Toll Like Receptor* se llevó a cabo utilizando la enzima Maximo Taq DNA Polymerase 5U/ $\mu$ l y MgCl<sub>2</sub> 100mM (GeneOn), *Fermentas Taq Buffer 10X with KCl* (Thermo Fisher Scientific) y dNTPs (Geneaid™) utilizando distintas concentraciones de MgCl<sub>2</sub> (1, 1.5, 2 y 2.5 mM) y rangos de temperatura (50-60°C) y determinar el más óptimo de ellos. Las reacciones de PCR se llevaron a cabo en un termociclador Applied Biosystems Abi 2720 GeneAmp. Las concentraciones finales establecidas para los reactivos y el programa final de amplificación se muestran en las tablas 6 y 7 respectivamente.

Para verificar si la amplificación de los genes se realizó con éxito, los productos de PCR fueron separados mediante electroforesis en un gel de Agarosa al 2.5% junto con un DNA ladder 100bp RTU (GeneDireX). Las condiciones de la corrida electroforética fueron 110 V por un tiempo de 20 minutos. La tinción del gel se realizó con Bromuro de Etidio (5mg/ml) y revelado en un transiluminador UV.

**Tabla 6: Protocolo de amplificación del exón 2 para los genes DPB1, DQB1 y DRB1 del MHC clase II**

Reactivo	Concentración inicial	Concentración final	Volumen x Tubo
Agua Estéril			20.325 $\mu$ l
Taq Buffer 10X	10X	1X	2.5 $\mu$ l
MgCl <sub>2</sub>	100 mM	1.5 mM	0.375 $\mu$ l
dNTPs	10 mM	0.08 mM	0.2 $\mu$ l
Cebador Forward	10 $\mu$ M	0.08 $\mu$ M	0.2 $\mu$ l
Cebador Reverse	10 $\mu$ M	0.08 $\mu$ M	0.2 $\mu$ l
Taq DNA Polymerase	5 U/ $\mu$ l	1 U	0.2 $\mu$ l
ADN	100 ng/ $\mu$ l	100 ng	1 $\mu$ l
Volumen final			25 $\mu$ l

**Tabla 7: Programa de amplificación para el exón 2 de los genes DPB1, DQB1 y DRB1 del MHC clase II**

Fase	Ciclos	Temperatura	Tiempo
Desnaturalización inicial	1	95°C	5 minutos
Desnaturalización	35	95°C	30 segundos
Hibridación	35	60°C	30 segundos
Extensión	35	72°C	30 segundos
Extensión final	1	72°C	5 minutos

### **3.8 Secuenciamiento**

Todos los fragmentos de ADN amplificados se enviaron a los laboratorios MCLAB (Molecular Cloning Laboratories). El formato seguido para el establecimiento de volúmenes y concentraciones previas para su correcto secuenciamiento, fue estipulado por la misma empresa según lo registrado en su propia página web (<https://www.mclab.com/lpage/sequencingpromotion/easyformat.html>). Se envió un volumen de 20µl de ADN amplificado de cada muestra a una concentración aproximada de 10ng/µl. Para los cebadores, se requirió una concentración de 5µM y un volumen total necesario para que cada muestra a secuenciar requiera de 5µl de estos. Previo al secuenciamiento, las muestras fueron purificadas mediante el protocolo propuesto por la empresa MCLAB (PCR clean-up). El secuenciamiento se realizó en un solo sentido (reverse) y bajo el protocolo *Easy Format<sup>TM</sup> Reaction* de la propia empresa MCLAB.

### **3.9 Calidad de secuencias**

La calidad de las secuencias obtenidas se evaluó visualizando los electroferogramas correspondientes de cada individuo obtenidos del secuenciamiento (archivo AB1). Estas ayudaron a identificar las posibles bases erradas nucleotídicas “N” resultantes para su corrección, el ruido obtenido en las secuencias y las bases que presenten heterocigosidad.

Usando el programa BioEdit v7.2.5 (Hall, 1999), las secuencias fueron alineadas entre sí con su secuencia genómica correspondiente de la base de datos del NCBI. Una vez alineadas, se extrajeron las posiciones desde el inicio hasta la última base de la región a analizar. Para comprobar la identidad de las secuencias extraídas, se realizó un alineamiento con la base de datos Genbank del NCBI mediante la herramienta *Blastn* (Zhang et al., 2000). Esto permitió corroborar si las secuencias extraídas fueron las correctas.

### **3.10 Reconstrucción de haplotipos**

Al ser las secuencias provenientes del ADN nuclear, los resultados obtenidos del secuenciamiento muestran el resultado de la combinación de 2 secuencias parentales. Es por ello por lo que el secuenciamiento llega a presentar en ciertas posiciones nucleotídicas picos superpuestos (heterocigosis). Mediante el programa PHASE v2.1.1 (Stephens et al., 2001; Stephens & Scheet, 2005) se reconstruyeron los haplotipos de cada individuo. Se

transformaron las bases nucleotídicas que presentaban heterocigosis a un código binario para obtener bajo el mismo código los resultados de las secuencias nucleotídicas más probables. Posteriormente se transforma el código binario resultante a las bases nucleotídicas obteniendo así los haplotipos parentales.

### **3.11 Análisis de la diversidad genética**

La diversidad genética de las secuencias fue estimada a través del cálculo de los índices de diversidad genética mediante el programa bioinformático DnaSP v6.12.03 (Rozas et al., 2017). Se calculó el número de haplotipos (h), número de sitios polimórficos (S), diversidad haplotípica (Hd), diversidad nucleotídica ( $\pi$ ), número promedio de diferencias a pares de individuos (k) y el estimador de Watterson ( $\theta_w$ ).

Para estimar los valores de la variabilidad y diferenciación genética, se utilizaron los programas bioinformáticos DnaSP v6.12.03 (Rozas et al., 2017), Arlequín v3.5.2.2 (Excoffier & Lischer, 2010) y el software NETWORK 10.0.

También se analizó el índice de diversidad molecular tales como: el número de transversiones (Tv), el número de transiciones (Ts), composición nucleotídica porcentual de las secuencias, entre otros. Estos valores fueron obtenidos mediante el programa Arlequín v3.5.2.2 (Excoffier & Lischer, 2010).

#### **3.11.1 Número de haplotipos (h)**

Son todos aquellos haplotipos diferentes dentro de una muestra. Es decir, el número de secuencias diferentes (Masatoshi Nei, 1987). Un haplotipo es aquel material genético haploide heredado por una sola línea parental (Pajares Chirre, 2018)

#### **3.11.2 Número de sitios polimórficos (S)**

Se refiere al número de posiciones en la secuencia que presentan por lo menos un polimorfismo (Barahona Padilla, 2014; Pajares Chirre, 2018). Los sitios polimórficos, dentro de una secuencia de ADN, pueden dividirse a su vez en:

- Sitios informativos: Son los sitios en los cuales hay, por lo menos, dos nucleótidos diferentes y uno de ellos con una frecuencia muy alta.
- Sitios no informativos (singletons): Son los sitios que contienen solamente un nucleótido distinto al ser comparados con las demás secuencias en un alineamiento.

### 3.11.3 Número promedio de diferencias nucleotídicas (k)

Es el promedio de diferencias nucleotídicas entre cada par de secuencias dentro de una muestra (Tajima, 1983). Depende en gran medida del número de posiciones y sólo es comparable en muestras de igual longitud.

El parámetro k se calcula mediante la siguiente ecuación:

$$k = \sum_{i=1; i < j}^n \frac{k_{ij}}{\binom{n}{2}}$$

Donde:

$k_{ij}$  = Número de diferencias entre la secuencia i y la secuencia j

n = número de secuencias

i = la secuencia i-ésima

j = la secuencia j-ésima

### 3.11.4 Estimador de Watterson Theta-W ( $\theta_w$ )

El estimador Watterson es un método para describir la diversidad genética en una población contando el número de sitios polimórficos. También es una medida de la "tasa de mutación poblacional" ligada a la diversidad de nucleótidos observada (Watterson, 1975).

El parámetro  $\theta_w$  se calcula con la siguiente ecuación:

$$\theta_w = \frac{S}{\sum_{i=1}^{n-1} \frac{1}{i}}$$

Donde:

S= número de sitios polimórficos

n= número de secuencias diferentes comparadas

i= la secuencia i-ésima

### 3.11.5 Diversidad haplotípica (Hd)

Nei (1987) la define como es la probabilidad de que 2 haplotipos tomados al azar sean diferentes. El valor de Hd varía dentro de un rango entre 0 y 1. Si todos los haplotipos son iguales el valor de Hd será 0 y si todos son distintos el valor de Hd será 1.

La diversidad haplotípica se calcula con la siguiente fórmula:

$$Hd = \frac{n}{n-1} \left( 1 - \sum_{i=1}^h p_i^2 \right)$$

Donde:

n= número de secuencias

h= número de haplotipos diferentes

p<sub>i</sub>= frecuencia del haplotipo i

i= la secuencia i-ésima

### 3.11.6 Diversidad nucleotídica ( $\pi$ )

Es la probabilidad de que 2 nucleótidos en la misma posición (homólogos) tomados al azar sean diferentes (Nei & Li, 1979). Se calcula determinando las diferencias nucleotídicas a pares de haplotipos ponderándolas con las frecuencias de éstos.

La diversidad nucleotídica varía en un rango de 0 a 1. Si las secuencias de una muestra presentan los mismos nucleótidos será 0 y si las secuencias de una muestra presentan todos los nucleótidos diferentes será 1 (Villanueva Cáceda, 2018).

Se calcula con la siguiente fórmula:

$$\pi = \frac{n}{n-1} \sum p_i p_j d_{ij}$$

Donde:

n= número de secuencias

p<sub>i</sub>= frecuencia del haplotipo i

p<sub>j</sub>= frecuencia del haplotipo j

d<sub>ij</sub>= proporción de nucleótidos diferentes entre los haplotipos i y j

### 3.12 Pruebas de neutralidad

Las pruebas de neutralidad son estadísticos que evalúan si las secuencias han evolucionado al azar (neutralmente) o si han sido influenciadas por eventos de selección, contracción o expansión, es decir, detectan desviación de la hipótesis nula de evolución neutral (Barahona Padilla, 2014). Las pruebas más empleadas son el estadístico D de Tajima (Tajima, 1989), el estadístico F<sub>s</sub> de Fu (Fu, 1997), el estadístico D\* de Fu y Li (Fu & Li, 1993) y el estadístico R<sub>2</sub> (Ramos-Onsins & Rozas, 2002).

Los estadísticos D de Tajima (Tajima, 1989) y F<sub>s</sub> de Fu (Fu, 1997), fueron calculados con el programa Arlequín v3.5.2.2 (Excoffier & Lischer, 2010). El estadístico D\* de Fu y Li (Fu & Li, 1993) y el estadístico R<sub>2</sub> (Ramos-Onsins & Rozas, 2002), se calcularon con el programa DnaSP v6.12.03 (Rozas et al., 2017). Ya que es imposible calcular el p-value exacto asociado a estadísticos, el nivel de significancia fue estimado con 10000 simulaciones de coalescencia y un intervalo de confianza del 95% con la herramienta coalescent Simulations (DnaSP v5) del software DnaSP v6.12.03. Solo el cálculo del estadístico D de Tajima se realizó a un nivel de confianza del 90%.

#### 3.12.1 D de Tajima

El parámetro D de Tajima calcula la diferencia entre dos medidas de diversidad genética: el número medio de diferencias nucleotídicas ( $\pi$ ) entre pares de secuencias y el número de sitios polimórficos (S). Se espera que estas medidas sean iguales en una población de tamaño constante que evoluciona de forma neutral (Tajima, 1989).

El índice D de Tajima se calcula de la siguiente manera:

$$D = \frac{d}{\sqrt{V(d)}}$$

$$d = \theta_{\pi} - \theta_w$$

$$\theta_{\pi} = \pi \times m$$

Donde:

d= diferencia entre 2 estimadores

V(d)= varianza de “d”

$\theta_{\pi}$ = estimador Theta-pi

$\theta_w$ = estimador de Watterson

$\pi$ = diversidad nucleotídica

m= tamaño en pares de bases de la secuencia

Si  $D = 0$  significa que las secuencias mutan de manera aleatoria, mientras que valores diferentes a cero permiten el rechazo de hipótesis nula de estabilidad poblacional:  $D < 0$  significa que hubo una expansión poblacional reflejada en el exceso de haplotipos raros de baja frecuencia, y  $D > 0$  indicaría la presencia de haplotipos frecuentes (selección positiva) y la carencia de haplotipos raros en la población (Barahona Padilla, 2014; Villanueva Cáceda, 2018).

### 3.12.2 Fs de Fu

Es considerado el índice más poderoso para detectar cambios poblacionales cuando el tamaño de muestra es grande (Barahona Padilla, 2014). Fu propone una estadística diferente basada en el modelo de mutación de sitios infinitos. Sugiere estimar la probabilidad de observar una muestra aleatoria con un número de alelos igual o menor que el valor observado según los niveles de diversidad ( $S'$ ) y el supuesto de que todos los alelos son selectivamente neutrales (Fu, 1997).

La ecuación para el cálculo de  $F_s$  es la siguiente:

$$F_s = \ln\left(\frac{S'}{1 - S'}\right)$$

Para valores  $F_s$  negativos, se evidencia un exceso en el número de alelos. Probablemente a ocurrido expansión poblacional reciente.

Para valores  $F_s$  positivos, se evidencia una deficiencia de alelos, probablemente por un reciente cuello de botella o un proceso de selección.

### 3.12.3 $D^*$ de Fu y Li

Fu & Li (1993) calculan un estadístico  $D$  como la diferencia de dos estimadores de  $\theta$ . Esta prueba se basa en que diferentes tipos de mutaciones se acumulan de forma diferente en una filogenia. Así, las mutaciones puramente neutrales pueden acumularse a lo largo de toda la filogenia, pero las mutaciones ligeramente deletéreas lo harán únicamente en las ramas externas, o lo que es lo mismo, son más recientes, puesto que la selección habrá tenido más tiempo para eliminar las mutaciones deletéreas que aparecieron hace más tiempo (Perfectti et al., 2009). Valores negativos significativos indicarían una expansión de la población.

Su cálculo se realiza de la siguiente manera:

$$D^* = \frac{\theta_{\xi_s} - \theta_w}{\sqrt{V(\theta_{\xi_s} - \theta_w)}}$$

$$\theta_{\xi_s} = \frac{n}{n-1} (\eta_s)$$

Donde:

$n$ = número de secuencias

$V(\theta_{\xi_s} - \theta_w)$  = varianza de la diferencia de los estimadores

$\theta_w$ = estimador de Watterson

$\eta_s$ = número de sitios no informativos (singletons)

### 3.12.4 Estadístico R<sub>2</sub>

Ramos-Onsins & Rozas (2002), desarrollaron una serie de pruebas basadas en la diferencia entre el número de sitios polimórficos no informativos (singleton) y el número medio de diferencias nucleotídicas. Una de esas pruebas es la R<sub>2</sub>. El fundamento de esta prueba es que el número esperado de singletons en una línea genealogía después de un reciente evento severo de crecimiento de la población es k/2. En consecuencia, se esperan valores más bajos de R<sub>2</sub> en este escenario demográfico.

F<sub>s</sub> y R<sub>2</sub> son las mejores pruebas estadísticas para detectar el crecimiento de la población. El comportamiento de R<sub>2</sub> es mejor para tamaños de muestra pequeños, mientras que F<sub>s</sub> es mejor para tamaños de muestra más grandes. También indican que el comportamiento de R<sub>2</sub> debería ser superior cuando se considera la recombinación intragénica (Ramos-Onsins & Rozas, 2002).

$$R_2 = \frac{\left( \frac{\sum_{i=1}^n \left( U_i - \frac{k}{2} \right)^2}{n} \right)^{\frac{1}{2}}}{S}$$

Donde:

n= número de secuencias

U<sub>i</sub>= número de sitios polimórficos no informativos (singletons) en la secuencia i

k= número promedio de diferencias nucleotídicas dentro de 2 secuencias

S= número total de polimorfismos en la secuencia

i= la secuencia i-ésima

### 3.13 Elaboración de la red de haplotipos

Para poder evaluar la relación entre los diferentes haplotipos encontrados de cada gen dentro de los camélidos sudamericanos, se elaboró una red de haplotipos. La elaboración de la red se construyó con el software NETWORK 10.0 (<http://www.fluxus-engineering.com>) empleando el método Median-Joining (Bandelt et al., 1999). El tamaño de cada haplotipo está directamente relacionado con su frecuencia en la población. Las conexiones con otros haplotipos permiten visualizar las variaciones genéticas que se dan. Posteriormente el gráfico obtenido fue elaborado nuevamente mediante el programa Adobe Illustrator.

### 3.14 Estimación del grado de diferenciación genética

La evaluación de la diferenciación genética se basa en cómo la distribución espacial y las frecuencias relativas de los alelos en los loci polimórficos difieren entre poblaciones (Smock, 2007). Se han empleado diversas técnicas para este propósito, incluido el análisis de aloenzimas, ADN mitocondrial, RAPDs y microsatélites (Bilton et al., 2001).

El índice de fijación  $F_{ST}$ , es el parámetro estadístico usado para determinar el grado de diferenciación genética entre las poblaciones o subpoblaciones determinadas, es decir, que tan diferentes o parecidos son estas (Sánchez Márquez, 2017; Valladares Delgado, 2019). Un valor 0 indica que las frecuencias alélicas son iguales y un valor 1 demuestra que las frecuencias alélicas son diferentes en las poblaciones y estas están fijadas (Avilés Esquivel, 2016).

El cálculo del índice de fijación usa la siguiente ecuación:

$$F_{st} = \frac{\sigma_a^2}{\sigma_T^2}$$

Donde:

$\sigma_a^2$  = Valor de la varianza debido al efecto entre grupos

$\sigma_T^2$  = Valor de la varianza total

Harlt & Clark (2007) clasifican los valores de  $F_{ST}$  de la siguiente manera:

$0 \leq F_{ST} < 0.05$  indicaría poca diferenciación genética.

$0.05 \leq F_{ST} < 0.15$  indicaría una diferenciación moderada.

$0.15 \leq F_{ST} < 0.25$  indicaría una gran diferenciación.

$0.25 \leq F_{ST}$  indicaría una diferenciación muy grande.

El cálculo del índice de fijación se realizó mediante el uso del programa Arlequín v3.5.2.2 (Excoffier & Lischer, 2010), estableciéndose los parámetros de 10000 permutación y una significancia de  $p\text{-value} < 0.05$  a evaluar entre las especies de camélidos.

### **3.15 Determinación de cambios aminoacídicos**

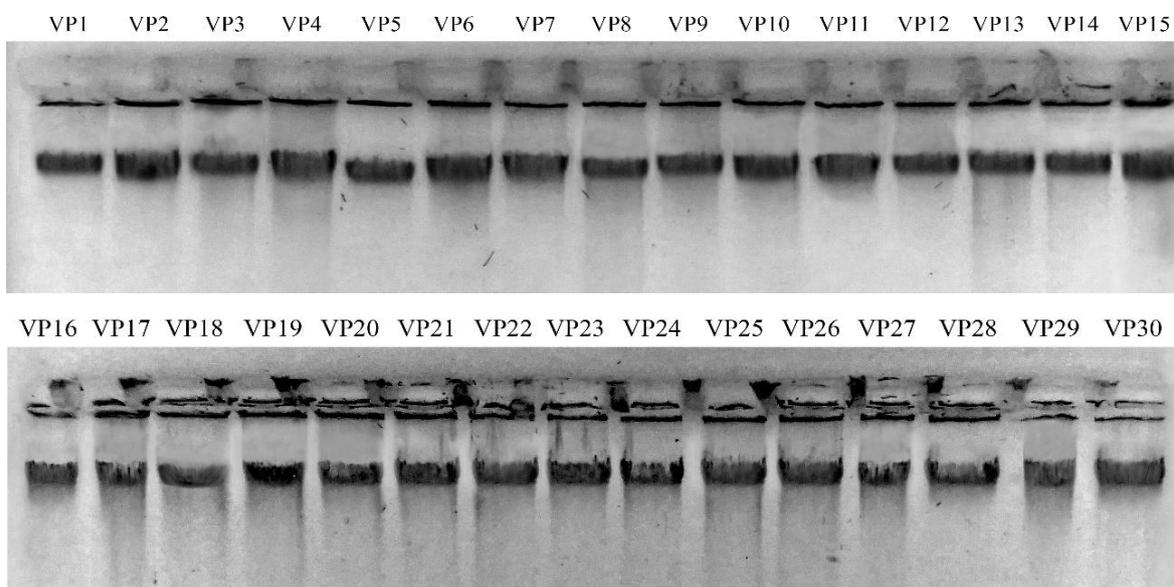
Con la ayuda del programa BioEdit v7.2.5 (Hall, 1999), se alinearon todas las secuencias de los respectivos genes y se identificaron los codones de inicio para cada secuencia. Una vez alineados se tradujeron las secuencias y se identificaron los posibles cambios de aminoácidos producidos debido a los cambios nucleotídicos identificados previamente. Estos cambios pueden ser sinónimos o representativos.

## IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

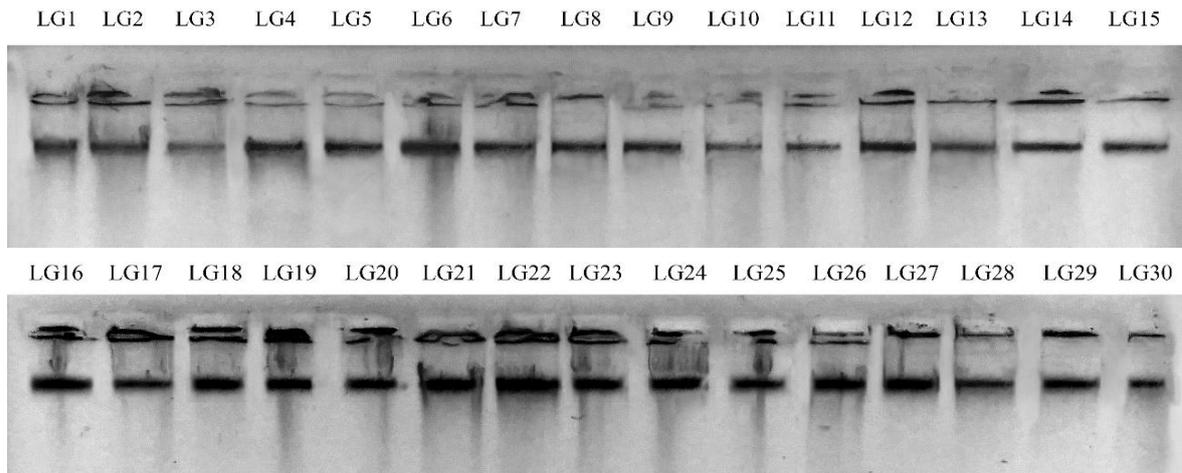
### 4.1 Extracción de ADN

La metodología basada en *Salting out* por Aljanabi et al. (1997) y modificada en el laboratorio de Ecología Molecular y Biodiversidad para la extracción de ADN, permitió obtener ADN integro sin fragmentación a partir de leucocitos. El resultado es fácilmente apreciable en geles de agarosa al 1% en las Figuras 10-12

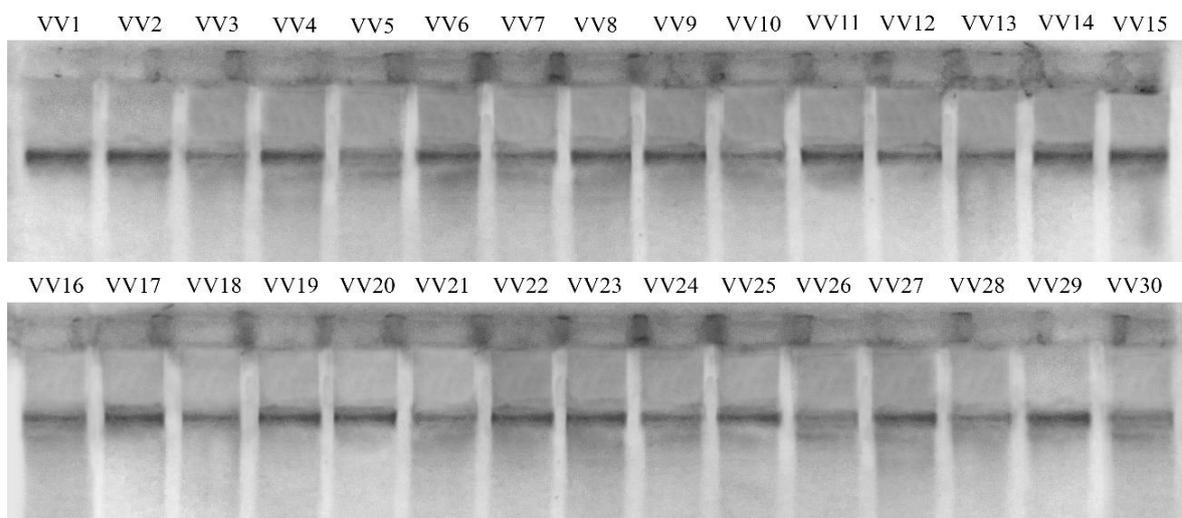
La calidad del ADN extraído resulto buena bajo la metodología propuesta de extracción en la gran mayoría de las muestras. Las concentraciones de ADN en ng/ $\mu$ l y sus purezas (A260/A280) se consideraron adecuadas para realizar las amplificaciones (Anexo 3).



**Figura 10.** Evaluación de la calidad de ADN por electroforesis en alpacas (código del individuo usado: VP (*Vicugna pacos*)).



**Figura 11.** Evaluación de la calidad de ADN por electroforesis en llamas (código del individuo usado: LG (*Lama glama*)).



**Figura 12.** Evaluación de la calidad de ADN por electroforesis en vicuñas (código del individuo usado: VV (*Vicugna vicugna*)).

La metodología *Salting Out* es rápida, económica y no contaminante ya que elimina casi la totalidad de proteínas durante la precipitación con sales. Puede ser usada para la extracción de ADN de varias especies de organismos, entre animales y plantas. Sin embargo, dependiendo del tipo de organismo y el tipo tejido, es necesario realizar ciertas modificaciones. Por ello, el laboratorio de ecología molecular y biodiversidad acuática, modifico el método de Aljanabi et al (1997) con el fin de poder extraer ADN de manera más satisfactoria a partir de tejido muscular en peces. Sin embargo, como reporta Barahona (2014), se pierde mucho ADN durante la eliminación de las proteínas con acetato de amonio.

Por ende, el uso de una muestra poco abundante como lo son glóbulos blancos haría que gran parte del ADN se pierda y se requiera una mayor cantidad de muestra. Es por ello por lo que se tuvo que realizar varias extracciones de una misma muestra para obtener una alta concentración final.

Barahona también reporta que para muestras escasas o aquellas muestras no invasivas (escamas, mucosa bucal o pelaje), es conveniente utilizar otras metodologías como sílica, Fenol: cloroformo: alcohol isoamílico, chelex 100 o kits comerciales.

## **4.2 Amplificación de los genes**

### 4.2.1 Diseño de cebadores

En primera instancia, se esperaba que los cebadores candidatos para los genes *TLR2* y *TLR4* fueran universales para diversas especies del orden *Artiodactyla* y *Perissodactyla* debido a que las secuencias presentaban un estado de conservación moderado. Sin embargo, el consenso entre las secuencias difería en una notable cantidad de bases. Se optó entonces por realizar el alineamiento con especies ganaderas, pero dio un resultado similar en cuanto a diferencias entre bases. Finalmente, se alinearon con los miembros de la familia *Camelidae* comprobándose que los cebadores eran altamente conservados.

Para el caso de los genes *DPB1*, *DQB1* y *DRB1*, no pudo realizarse un alineamiento con otras especies debido a la alta variabilidad que presentan estas secuencias genómicas. Solo las secuencias entre la familia *Camelidae*, presentaron un alto estado de conservación.

```

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
1210      1220      1230      1240      1250      1260      1270      1280
Vicugna pacos      CTGCAAAACCT TAATTTTAAAG GC AAAATCAT TTGAAATCAT TGGAAAAAAC TGGCGAAGTT TTGCTTACTC TGAAAAACCT
Camelus dromedarius CTGCAAAACCT TAATTTTAAAG GC AAAATCAT TTGAAATCAT TAGAAAAAAC TGGCGAAGTT TTGCTTACTC TGAAAAACCT
Camelus bactrianus CTGCAAAACCT TAATTTTAAAG GC AAAATCAT TTGAAATCAT TAGAAAAAAC TGGCGAAGTT TTGCTTACTC TGAAAAACCT
Ceratotherium simum CTACAAACCT TAATTTTAAAG GC AAAATCAT TTGACATCGT TAGAAAAAAC TGGAGAAACT TTGCTTACTC TGAAAAACCT
Equus asinus      CTCCAAACCT TAATTTTAAAG GC AAAATCAT TTGACGTCAT TAGAAAAAAC TGGAGAAACT TTGCTTACTC TGAAAAACCT
Equus caballus    CTCCAAACCT TAATTTTAAAG GC AAAATCAT TTGACGTCAT TAGAAAAAAC TGGAGAAACT TTGCTTACTC TGAAAAACCT
Equus przewalskii CTCCAAACCT TAATTTTAAAG GC AAAATCAT TTGACGTCAT TAGAAAAAAC TGGAGAAACT TTGCTTACTC TGAAAAACCT
Sus scrofa      CTACACACTT TAATTTTAAAG GC AAAATCAT TTGAAATCAT TAGAAAAAAC TGGAGAAGTT TTGTTACTC TGAAAAACCT
Bubalus bubalis  CTTCAAACCT TGGTTTTAAG GCAGAATCGT TTGAAATCAC TAGAAAAAAC GGGAGAAGTT TTGTTACTC TGAAAAATCT
Bison bison bison CTTCAAACCT TGGTTTTAAG GCAGAATCGT TTGAAATCAC TAGAAAAAAC GGGAGAAGTT TTGTTACTC TGAAAAATCT
Bos taurus      CTTCAAACCT TGGTTTTAAG GCAGAATCGT TTGAAATCAC TAGAAAAAAC GGGAGAAGTT TTGTTACTC TGAAAAATCT
Bos indicus     CTTCAAACCT TGGTTTTAAG GCAGAATCGT TTGAAATCAC TAGAAAAAAC GGGAGAAGTT TTGTTACTC TGAAAAATCT
Bos mutus       CTTCAAACCT TGGTTTTAAG GCAGAATCGT TTGAAATCAC TAGAAAAAAC GGGAGAAGTT TTGTTACTC TGAAAAATCT
Capra hircus    CTTCAAACCC TGGTTTTAAG GCAGAATCGT TTGAAATCAC TAGAAAAAAC TGGAGAAGTT TTGTTACTC TGAAAAATCT
Ovis aries      CTTCAAACCC TGGTTTTAAG GCAGAATCGT TTGAAATCAC TAGAAAAAAC TGGAGAAGTT TTGTTACTC TGAAAAATCT
Pantholops hodgsoni CTTCAAACCC TGGTTTTAAG GCAGAATCGT TTCAAATCAC TAGAAAAAAC TGGAGAAGTT TTGTTACTC TGAAAAATCT
Clustal Consensus  ** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
Primer Forward     ----- --GCTGTCAA ACACAATCAC TC----- -----
Clustal Consensus  * * * * * * * * * * * * * * * * *
Primer Reverse     -----
Clustal Consensus

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
810      820      830      840      850      860      870      880
Vicugna pacos      CTTTAGAAAT GTAAAAATCA CTGATGAAAG TTTTAGTGAG CTGGTGAAC TGCTGAATTA TATTTCTGGG ATGTTAGAAG
Camelus dromedarius CTTTAGAAAT GTAAAAATCA CTGATGAAAG TTTTAGTGAG CTGGTGAAC TGCTGAATTA TATTTCTGGG ATGTTAGAAG
Camelus bactrianus CTTTAGAAAT GTAAAAATCA CTGATGAAAG TTTTAGTGAG CTGGTGAAC TGCTGAATTA TATTTCTGGG ATTTAGAAG
Ceratotherium simum ATTTAGAAAT GTGAAATCA CTGATGAAAG TTTTAAATGAA GTTGTGAAC TGTTGAATTA CGTTTCTGGA GAGTTCGAAT
Equus asinus      ATTTAGAAAT GTGAAATCA CTGATGAAAG TTTTGTGAA AITGTGAAGC TGTTGAATTA TATTTCTGGA GTGTCAGAAG
Equus caballus    ATTTAGAAAT GTGAAATCA CTGATGAAAG TTTTGTGAA AITGTGAAGC TGTTGAATTA TATTTCTGGA GTGTCAGAAG
Equus przewalskii ATTTAGAAAT GTGAAATCA CTGATGAAAG TTTTGTGAA AITGTGAAGC TGTTGAATTA TATTTCTGGA GTGTCAGAAG
Sus scrofa      GTTTCGAAG GCAGAAATCA CTGACGCAAG TTTTACGGAA AITGTGAAC TGTTAAATTA TTTTCTGGA GCCTTAGAAG
Bubalus bubalis  ATTTAGAAAT GTGCAATTCA CCGATGAAAG TTTTGTGAA GTTGTCAAC TGTTAACTA TTTTCTGGG ATCTTAGAAG
Bison bison bison ATTTAGAAAT GTGCAATTCA CCGATGAAAG TTTTGTGAA GTTGTCAAC TGTTAACTA TTTTCTGGG ATTTAGAAG
Bos taurus      ATTTAGAAAT GTGCAATTCA CCGATGAAAG TTTTGTGAA GTTGTCAAC TGTTAACTA TTTTCTGGG ATCTTAGAAG
Bos indicus     ATTTAGAAAT GTGCAATTCA CCGATGAAAG TTTTGTGAA GTTGTCAAC TGTTAACTA TTTTCTGGG ATCTTAGAAG
Bos mutus       ATTTAGAAAT GTGCAATTCA CCGATGAAAG TTTTGTGAA GTTGTCAAC TGTTAACTA TTTTCTGGG ATCTTAGAAG
Capra hircus    ATTTAGAAAT GTGCAATTCA CCGATGAAAG TTTTGTGAA GTTGTCAAC TGTTAACTA TTTTCTGGG ATCTTAGAAG
Ovis aries      ATTTAGAAAT GTGCAATTCA CCGATGAAAG TTTTGTGAA GTTGTCAAC TGTTAACTA TTTTCTGGG ATCTTAGAAG
Pantholops hodgsoni GTTTAGAAC GTGCAATTCA CCGATGAAAG TTTTGTGAA GTTGTCAAC TGTTAACTA TTTTCTGGG ATCTTAGAAG
Clustal Consensus  * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
Primer Forward     -----
Clustal Consensus  -----
Primer Reverse     ----- --TTAGTGAG CTGGTGAAC TG----- -----
Clustal Consensus  * * * * * * * * * * * * * * * * *

```

**Figura 13.** Alineamiento del cebador *forward* y *reverse* para el gen *TLR2* en animales del orden *Artiodactyla* y *Perissodactyla*.

```

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
          360      370      380      390      400      410      420
Vicugna pacos GCATTTTACA AAGTGTITTT CAAGA-CAAG CATTAAAGATA TGCTGTCAAA CACAATCACT CATTTGAACC
Sus scrofa ----CACACA CAAGTGTGCG TTACAICTTA TAAAACATCT CACTGTTAAA CACAGTCACT CACTTGCACC
Bos taurus ----CTTACA GAACATTTCT CAAGAAGTGG AAITAAGCCA TGATGTCAAA CACAGTCAIT CATTTGAACC
Equus caballus ----CTTACA GAACGTTTCT CAAGAAGTGG AATTACGATA CCCTGTCAAA CA--ATCACT CATCTGAATG
Capra hircus ----CTTACA GAATGTTTCT CAAGAAGTGG AAITAAGCCA TGATGTCAAA CACAGTCAIT CATTTGAACC
Ovis aries ----CTTACA GAACGTTTCT CAAGAAGTGG AAITAAGCCA TGATGTCAAA CACAGTCAIT CATTTGAACC
Clustal Consensus
Primer Forward -----GCTGTCAAA CACAATCACT C-----
Clustal Consensus
Primer Reverse -----
Clustal Consensus

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
          1210     1220     1230     1240     1250     1260     1270     1280
Vicugna pacos TGGATTAAACA AGTTGACCTT TAGAAATGTA AAAATCACTG ATGAAAGTIT TAGTGAGCTG GIGAAACTGC TGAATTATAT
Sus scrofa GTGATGAAAA AATTACGTT TCGAAAGGCA GAAATCACTG ACGCAAGTIT TACGGAAATI GIGAAACTGT TAAATTATGT
Bos taurus ICGGTTAAAA AGCTTATATT TAGAAATGTA CAATTCACCG ATGAAAGTIT TGTTGAAGTT GICAAACTGT TTAACTATGT
Equus caballus TTGATTAAAA AGTTCACAIT TAGAAATGTA AAAATCACTG ATGAAAGTIT TGATGAAATI GIGAAACTGT TGAATTATAT
Capra hircus ICAGTTAAAA AGCTTATATT TAGAAATGTA CAATTCACCG ATGAAAGTIT TGTTGAAGTT GICAAACTGT TTAACTATGT
Ovis aries ICAGTTAAAA AGCTTACAIT TAGAAATGTA CAATTCACCG ATGACAGTIT TGTTGAAGTT GICAAACTGT TTAACTATGT
Clustal Consensus
Primer Forward -----
Clustal Consensus
Primer Reverse -----T TAGTGAGCTG GIGAAACTG-----
Clustal Consensus

```

Figura 14. Alineamiento del cebador *forward* y *reverse* para el gen *TLR2* en especies ganaderas.

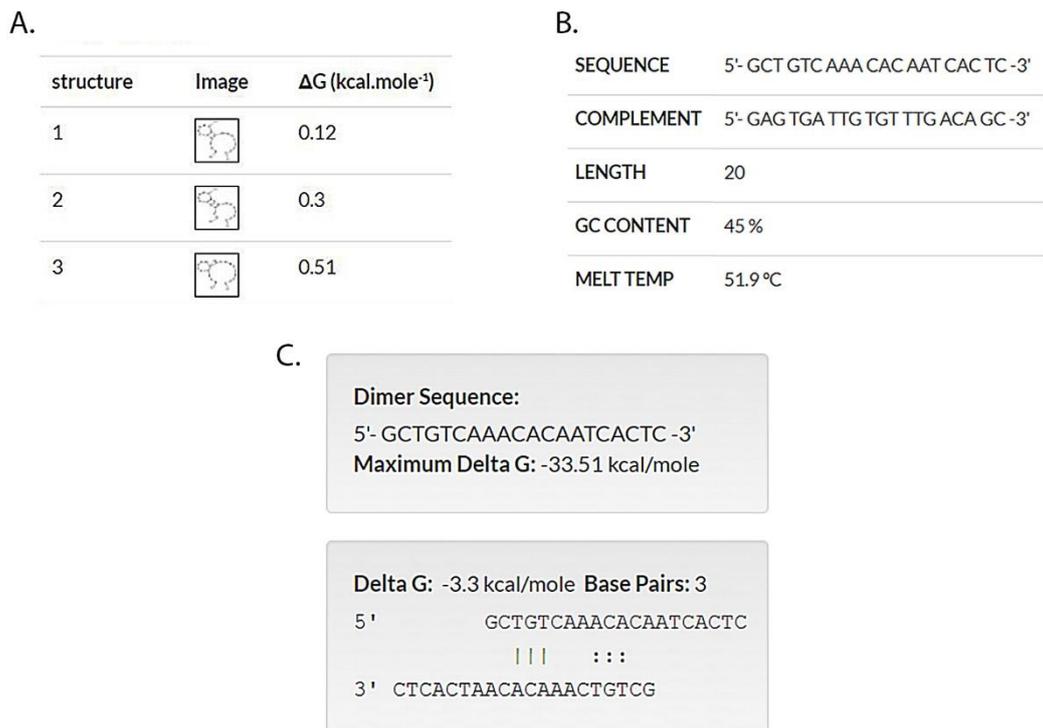
```

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
          330      340      350      360      370      380      390      400
Vicugna pacos TTTTICAAGA CAAGCATTAA GATATGCTGI CAAACACAAT CACTCATTIG AACCTCTCTT ATTIGTAGGT TGCCTGCTG
Camelus dromedarius TTTTICAAGA CAAGAATTAA GATATGCTGI CAAACACAAT CACTCATTIG AACCTCTCTT ATTIGTAGGT TGCCTGCTG
Camelus bactrianus TTTTICAAGA CAAGAATTAA GATATGCTGI CAAACACAAT CACTCATTIG AACCTCTCTT ATTIGTAGGT TGCCTGCTG
Clustal Consensus
Primer Forward -----GCTGI CAAACACAAT CACTC-----
Clustal Consensus
Primer Reverse -----
Clustal Consensus

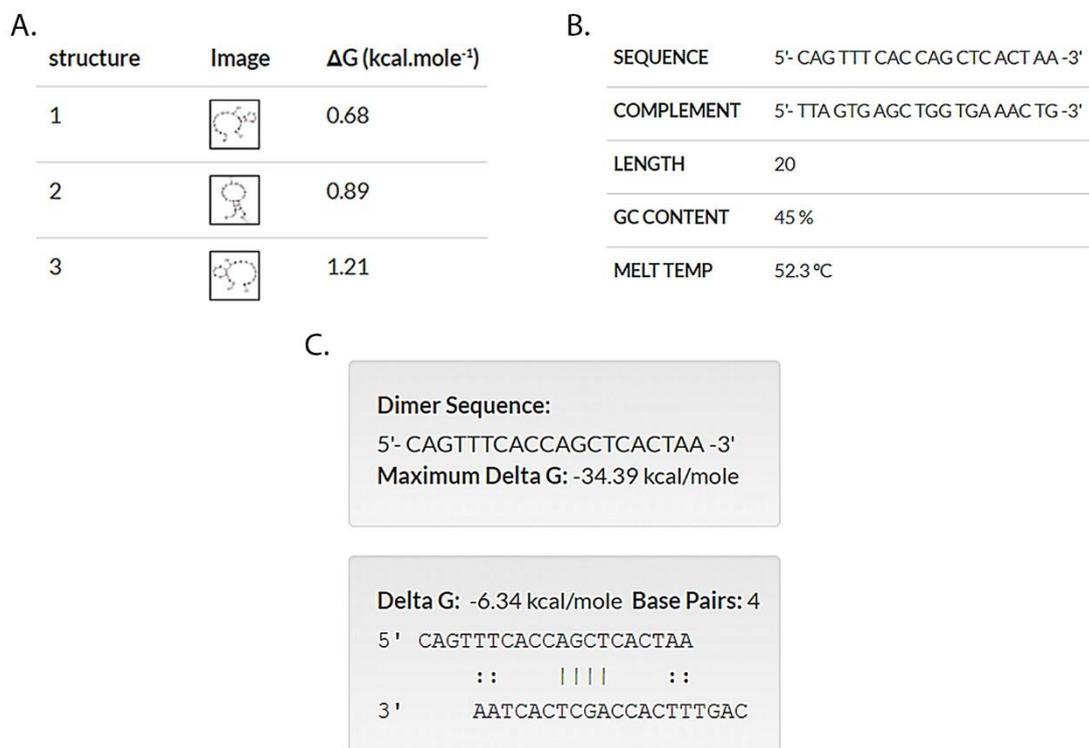
.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
          1210     1220     1230     1240     1250     1260     1270     1280
Vicugna pacos GTTTITAGTGA GCTGGTGAAA CTGCTGAATT ATATTICTGG GATGTTAGAA GTAGAGTTTG ATGGCTGCAC CCTGAACGGA
Camelus dromedarius GTTTITAGTGA GCTGGTGAAA CTGCTGAATT ATATTICTGG GATGTTAGAA GTAGAGTTTG ATGGCTGCAC CCTGAACGGA
Camelus bactrianus GTTTITAGTGA GCTGGTGAAA CTGCTGAATT ATATTICTGG GATGTTAGAA GTAGAGTTTG ATGGCTGCAC CCTGAACGGA
Clustal Consensus
Primer Forward -----
Clustal Consensus
Primer Reverse ---TTAGTGA GCTGGTGAAA CTG-----
Clustal Consensus

```

Figura 15. Alineamiento del cebador *forward* y *reverse* para el gen *TLR2* en la familia *Camelidae*.



**Figura 16.** Análisis fisicoquímico del cebador *forward* para el gen *TLR2* usando Oligoanalyzer del IDT. A. Análisis *Hairpin*. B. Análisis tamaño, %G/C y temperatura de fusión (Tm). C. Análisis *self-dimer*.



**Figura 17.** Análisis fisicoquímico del cebador *reverse* para el gen *TLR2* usando Oligoanalyzer del IDT. A. Análisis *Hairpin*. B. Análisis tamaño, %G/C y temperatura de fusión (Tm). C. Análisis *self-dimer*.

Primary Sequence: 5'- GCTGTCAAACACAATCACTC -3'  
 Secondary Sequence: 5'- CAGTTTCACCAGCTCACTAA -3'

Maximum Delta G: -34.39 kcal/mole

Delta G: -6.69 kcal/mole Base Pairs: 4

5'           GCTGTCAAACACAATCACTC  
               |||        ::  
 3' AATCACTCGACCACTTTGAC

Figura 18. Análisis hetero-dimer de los cebadores forward y reverse para el gen TLR2 usando Oligoanalyzer del IDT.

```

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
      890     900     910     920     930     940     950     960
Vicugna pacos   CTC AAGGAA ATGATTGAG TTTC AAGGGT TGCTGTTCTC AACTGATTI CGGGACAACC AAACGAAGT ATTTAGATCT
Camelus ferus   CTC AAGGAA ATGATTGAG TTTC AAGGGT TGCTGTTCTC AACTGATTI TGGGACAACC AAACGAAGT ATTTAGATCT
Camelus dromedarius CTC AAGGAA ATGATTGAG TTTC AAGGGT TGCTGTTCTC AACTGATTI TGGGACAACC AAACGAAGT ATTTAGATCT
Camelus bactrianus CTC AAGGAA ATGATTGAG TTTC AAGGGT TGCTGTTCTC AACTGATTI TGGGACAACC AAACGAAGT ATTTAGATCT
Sus scrofa      CTC AAGGAA ATGATTGAG TTTC AAGGGT TGCTGTTCTC AACTGATTI TGGGACAACC AAACGAAGT ATTTAGATCT
Bison bison bison CTC AAGGAA ATGATTGAG TTTC AAGGGT TGCTGTTCTC AACTGATTI TGGGACAACC AAACGAAGT ATTTAGATCT
Bos taurus      CTC AAGGAA ATGATTGAG TTTC AAGGGT TGCTGTTCTC AACTGATTI TGGGACAACC AAACGAAGT ATTTAGATCT
Bos indicus     CTC AAGGAA ATGATTGAG TTTC AAGGGT TGCTGTTCTC AACTGATTI TGGGACAACC AAACGAAGT ATTTAGATCT
Bos mutus       CTC AAGGAA ATGATTGAG TTTC AAGGGT TGCTGTTCTC AACTGATTI TGGGACAACC AAACGAAGT ATTTAGATCT
Equus caballus  CTC AAGGAA ATGATTGAG TTTC AAGGGT TGCTGTTCTC AACTGATTI TGGGACAACC AAACGAAGT ATTTAGATCT
Equus asinus    CTC AAGGAA ATGATTGAG TTTC AAGGGT TGCTGTTCTC AACTGATTI TGGGACAACC AAACGAAGT ATTTAGATCT
Capra hircus    CTC AAGGAA ATGATTGAG TTTC AAGGGT TGCTGTTCTC AACTGATTI TGGGACAACC AAACGAAGT ATTTAGATCT
Ovis aries      CTC AAGGAA ATGATTGAG TTTC AAGGGT TGCTGTTCTC AACTGATTI TGGGACAACC AAACGAAGT ATTTAGATCT
Bubalus bubalis CTC AAGGAA ATGATTGAG TTTC AAGGGT TGCTGTTCTC AACTGATTI TGGGACAACC AAACGAAGT ATTTAGATCT
Clustal Consensus ***** ** * * * ***** * * * * * ***** * * * * *
Primer Forward  ----- -TTCAAGGGT TGCTGTTCTC -----
Clustal Consensus ----- ** * * * ***** -----
Primer Reverse  ----- -----
Clustal Consensus ----- -----

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
      1450    1460    1470    1480    1490    1500    1510    1520
Vicugna pacos   TTG GCAAGG AGCCTCGCTI TTTTAAACCTI TACTCAGAA TACTTGTGCTI GTGTTTGIGA ACACCAGCAT TTCCTGCAGI
Camelus ferus   TTG GCAAGG AGCCTTGCTI TTTTAAACCTI TACTCAGAA TACTTGTGCTI GTGTTTGIGA ACACCAGCAT TTCCTGCAGI
Camelus dromedarius TTG GCAAGG AGCCTTGCTI TTTTAAACCTI TACTCAGAA TACTTGTGCTI GTGTTTGIGA ACACCAGCAT TTCCTGCAGI
Camelus bactrianus TTG GCAAGG AGCCTTGCTI TTTTAAACCTI TACTCAGAA TACTTGTGCTI GTGTTTGIGA ACACCAGCAT TTCCTGCAGI
Sus scrofa      ICT GCAAGG AGCCTAGCTI TTTTAAATCTI CACTAAGAA TACTTGTGCTI GTGCTGIGA ACACCAGCAT TTCCTGCAGI
Bison bison bison TTG GCAAGG AGCCTCACTI GGCTAAATCTI TACTCAGAA GCATTTGCTI GTGTTTGIGA ACATCAGAGT TTCCTGCAGI
Bos taurus      TTG GCAAGG AGCCTCACTI GGCTAAATCTI TACTCAGAA GCATTTGCTI GTGTTTGIGA ACATCAGAGT TTCCTGCAGI
Bos indicus     TTG GCAAGG AGCCTCACTI GGCTAAATCTI TACTCAGAA GCATTTGCTI GTGTTTGIGA ACATCAGAGY TTCCTGCAGI
Bos mutus       TTG GCAAGG AGCCTCACTI GGCTAAATCTI TACTCAGAA GCATTTGCTI GTGTTTGIGA ACATCAGAGT TTCCTGCAGI
Equus caballus  TTTTCCAAGT AGTCTAGCTI CCTTAAATCTI TACTCAGAA TACTTGTGCTI GTGTTTGIGA ATACCAGAGT TTCCTGCAGI
Equus asinus    TTTTCCAAGT AGTCTAGCTI CCTTAAATCTI TACTCAGAA TACTTGTGCTI GTGTTTGIGA ATACCAGAGT TTCCTGCAGI
Capra hircus    TTG GCAAGG AACCTCACTI GGCTAAATCTI TACTCAGAA GAATTTGCTI GTGTTTGIGA ACATCAGAGT TTCCTGCAGI
Ovis aries      TTG GCAAGG AACCTCACTI GGCTAAATCTI TACTCAGAA GAATTTGCTI GTGTTTGIGA ACATCAGAGT TTCCTGCAGI
Bubalus bubalis TTG GCAAGG AACCTCACTI GGCTAAATCTI TACTCAGAA GCATTTGCTI GTGTTTGIGA ACATCAGAGT TTCCTGCAGI
Clustal Consensus * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
Primer Forward  ----- -----
Clustal Consensus ----- -----
Primer Reverse  ----- -----TGA ACACCAGCAT TTCCTG-----
Clustal Consensus ----- ** * * * ***** -----
  
```

Figura 19. Alineamiento del cebador forward y reverse para el gen TLR4 en animales del orden Artiodactyla y Perissodactyla.

```

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
      890      900      910      920      930      940      950      960
Vicugna pacos   CTCAAGGGAA ATGATTGAG TTCAAGGGT TGCTGTTCTC AACTGATT  CGGGACAACC AAAGTGAAGT ATTAGATCT
Sus scrofa      CTCAGTGGAA ATCACTTGAG CTTTAAAGT  TGCTGTTCTC ACAATGAATT TGGGACAACC AAAGTGAAGC ATTAGATCT
Bos taurus      CTCAAAGAA  ATCACTTGAG TTCAAGGGT  TGCTGTTCTC AACTGATT  TGGGACAACC AACCTGAAGC ATTAGATCT
Equus caballus  CTCAGCAGAA ATCGCTTGAG TTCAAGTCC  TGCTGTTCTG AGGCTGATT  GAAGACAACC AGACTGAAGC ATTAGATCT
Capra hircus    CTCAAAGAA  ATCACTTGAG TTCAAGACC  TGCTGTTCTC AACTGATT  TGGGACAACC AACCTGAAGC ATTAGATCT
Ovis aries      CTCAAAGAA  ATCACTTGAG TTCAAGAGC  TGCTGTTCTC AACTGATT  TGGGACAACC AACCTGAAGC ATTAGATCT
Clustal Consensus
Primer Forward  ----- -TTCAAGGGT TGCTGTTCTC -----
Clustal Consensus
Primer Reverse  -----
Clustal Consensus

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
      1450     1460     1470     1480     1490     1500     1510     1520
Vicugna pacos   TTGCCAAGG AGCCTCGCTT TTTTAAACCT TACTCAGAA  GACTTIGCTT GTGTTTGTA  ACACCAGCAT TTCCTGCAGT
Sus scrofa      ICTGCCAAGG AGCCTAGCTT TTTTAAATCT CACTAAGAA  GACTTITCTT GTGCGTGTG  ACACCAGACT TTCCTGCAGT
Bos taurus      TTGCCAAGG AGCCTCAGT  GGCTAAATCT TACTCAGAA  GCATTIGCTT GTGTTTGTA  ACATCAGAGT TTCCTGCAGT
Equus caballus  TTTTCCAAGT AGTCTAGCTT CCTTAAATCT TACTCAGAA  GACTTIGCTT GTGTTTGTA  ATACCAGAGT TTCCTGCAGT
Capra hircus    TTGCCAAGG AACCTCAGT  GGCTAAATCT TACTCAGAA  GAATTIGCTT GTGTTTGTA  ACATCAGAGT TTCCTGCAGT
Ovis aries      TTGCCAAGG AACCTCAGT  GGCTAAATCT TACTCAGAA  GAATTIGCTT GTGTTTGTA  ACATCAGAGT TTCCTGCAGT
Clustal Consensus
Primer Forward  -----
Clustal Consensus
Primer Reverse  -----TGA ACACCAGCAT TTCCTG-----
Clustal Consensus

```

Figura 20. Alineamiento del cebador *forward* y *reverse* para el gen *TLR4* en especies ganaderas.

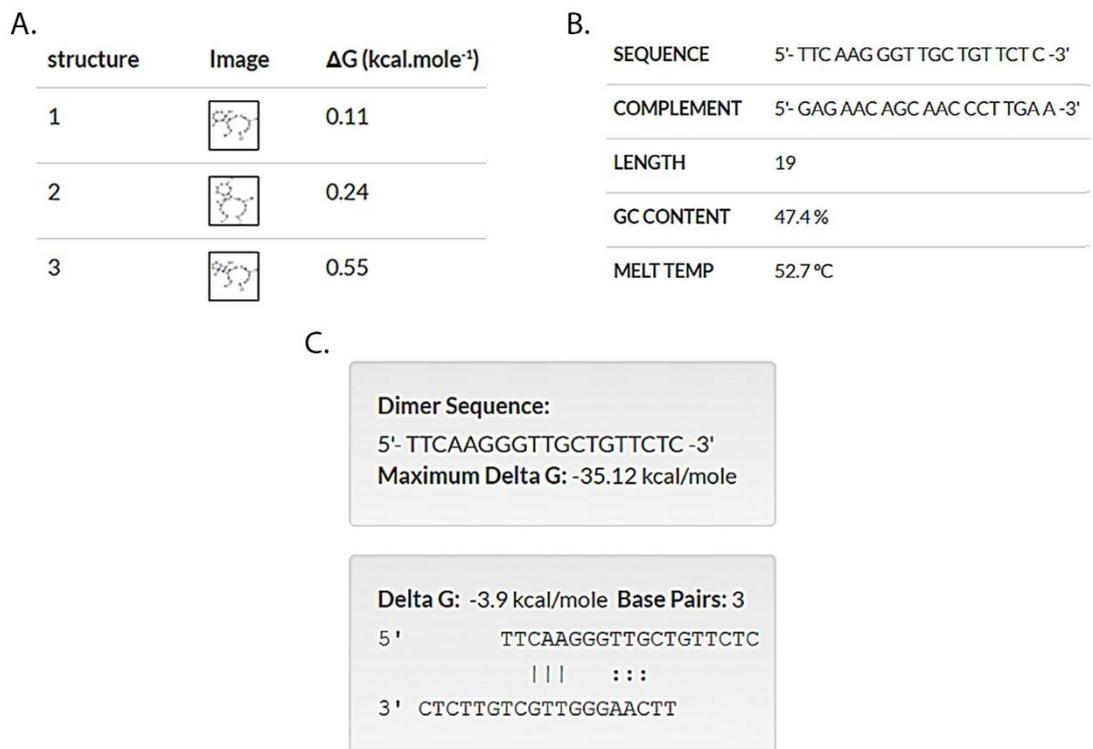
```

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
      890      900      910      920      930      940      950      960
Vicugna pacos   CTCAAGGGAA ATGATTGAG TTCAAGGGT TGCTGTTCTC AACTGATT  CGGGACAACC AAAGTGAAGT ATTAGATCT
Camelus ferus   CTCAAGGGAA ATGATTGAG TTCAAGGGT  TGCTGTTCTC AACTGATT  TGGGACAACC AAAGTGAAGT ATTAGATCT
Camelus dromedarius
Camelus bactrianus
Clustal Consensus
Primer Forward  ----- -TTCAAGGGT TGCTGTTCTC -----
Clustal Consensus
Primer Reverse  -----
Clustal Consensus

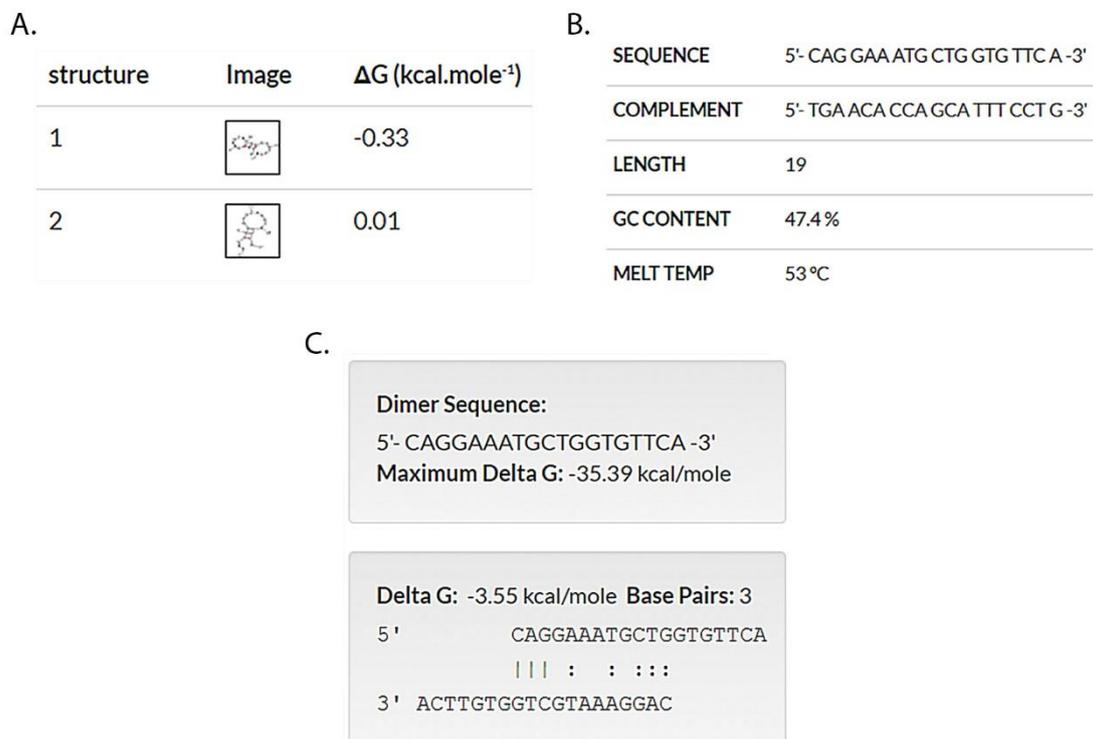
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
      1450     1460     1470     1480     1490     1500     1510     1520
Vicugna pacos   TTGCCAAGG AGCCTCGCTT TTTTAAACCT TACTCAGAA  GACTTIGCTT GTGTTTGTA  ACACCAGCAT TTCCTGCAGT
Camelus ferus   TTGCCAAGG AGCCTIGCTT TTTTAAACCT TACTCAGAA  GACTTIGCTT GTGTTTGTA  ACACCAGCAT TTCCTGCAGT
Camelus dromedarius
Camelus bactrianus
Clustal Consensus
Primer Forward  -----
Clustal Consensus
Primer Reverse  -----TGA ACACCAGCAT TTCCTG-----
Clustal Consensus

```

Figura 21. Alineamiento del cebador *forward* y *reverse* para el gen *TLR4* en la familia *Camelidae*.



**Figura 22.** Análisis fisicoquímico del cebador *forward* para el gen *TLR4* usando Oligoanalyzer del IDT. A. Análisis *Hairpin*. B. Análisis tamaño, %G/C y temperatura de fusión (Tm). C. Análisis *self-dimer*.



**Figura 23.** Análisis fisicoquímico del cebador *reverse* para el gen *TLR4* usando Oligoanalyzer del IDT. A. Análisis *Hairpin*. B. Análisis tamaño, %G/C y temperatura de fusión (Tm). C. Análisis *self-dimer*.

Primary Sequence: 5'- TTCAAGGGTTGCTGTTCTC -3'  
 Secondary Sequence: 5'- CAGGAAATGCTGGTGTTC -3'

Maximum Delta G: -35.39 kcal/mole

Delta G: -3.55 kcal/mole Base Pairs: 3

```

5'      TTCAAGGGTTGCTGTTCTC
      ::      :: |||
3' ACTTGTGGTCGTAAAGGAC
  
```

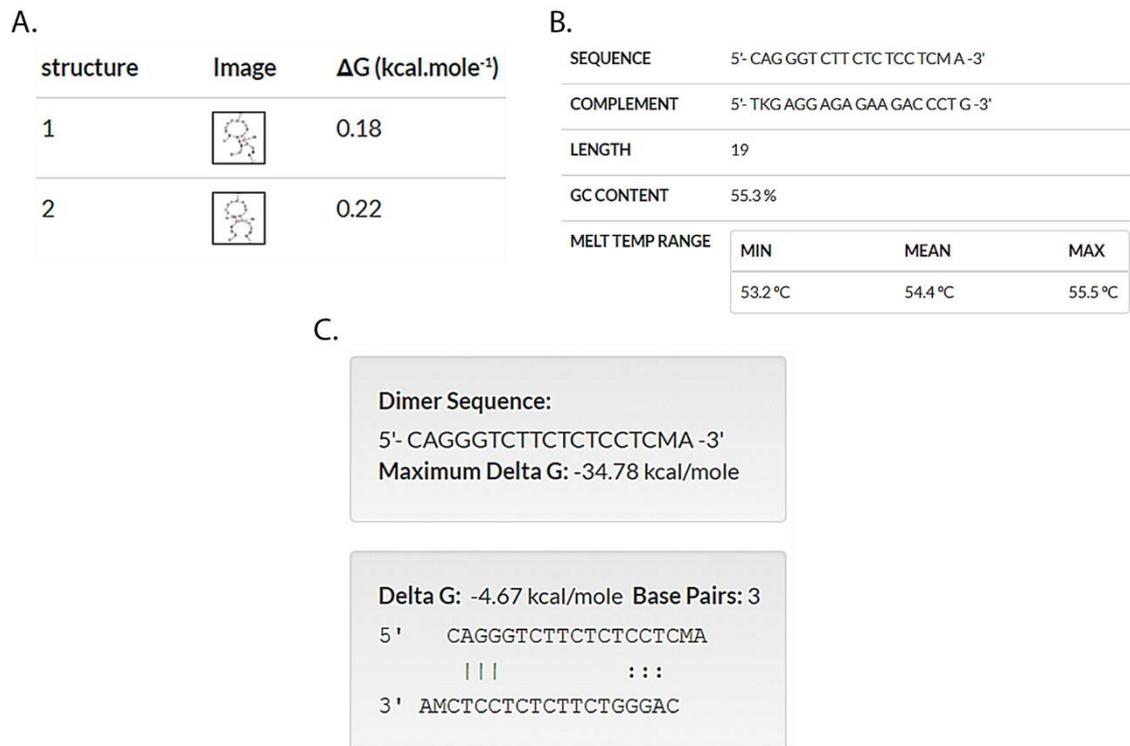
**Figura 24.** Análisis *hetero-dimer* de los cebadores *forward* y *reverse* para el gen *TLR4* usando Oligoanlyzer del IDT.

```

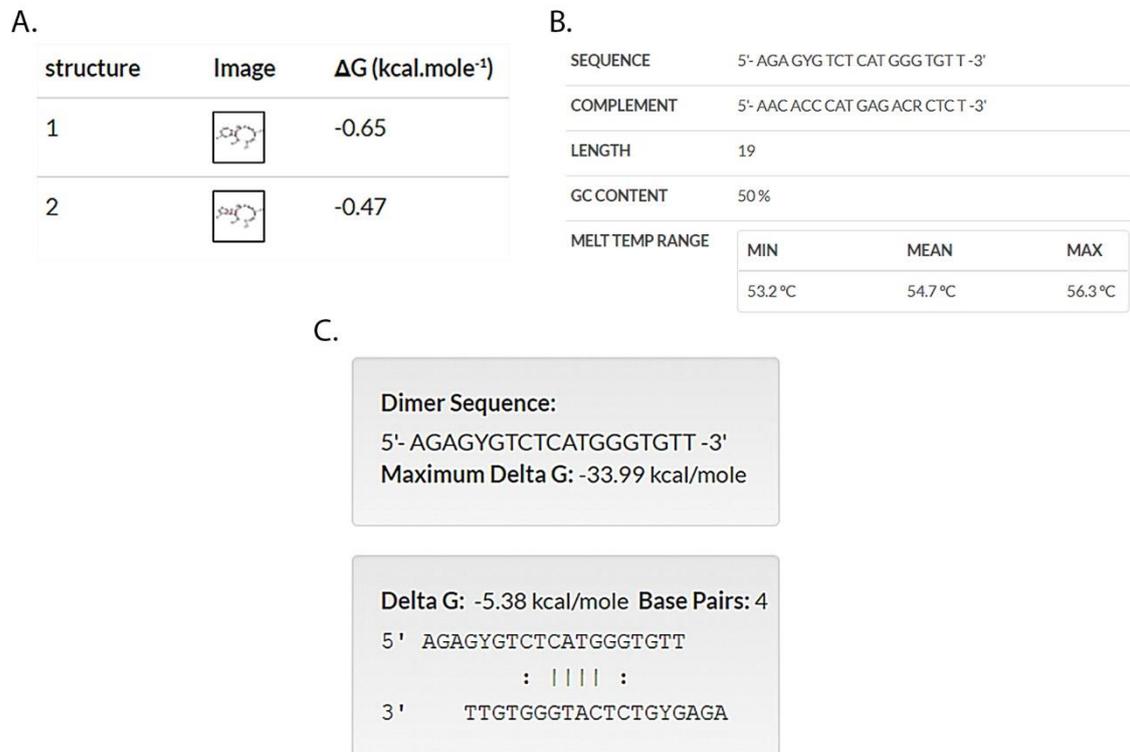
.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
      150      160      170      180      190      200      210
Camelus ferus      AGAIGGGTCC CCTCCTCTGC GGCCTGAGCC CACCCCTCC AGGGTCTTCT CTCCTCCACC AGCCCTCTCA
Camelus dromedarius AGAIGGGTCC CCTCCTCTGC GGCCTGAGCC CACCCCTCC AGGGTCTTCT CTCCTCCACC AGCCCTCTCA
Camelus bactrianus  AGAIGGGTCC CCTCCTCTGC GGCCTGAGCC CACCCCTCC AGGGTCTTCT CTCCTCCACC AGCCCTCTCA
Vicugna pacos      AGAIGGGTCC CCTCCTCTGC GGCCTGAGCC CACCCCTCC AGGGTCTTCT CTCCTCAACC AGCCCTCTCA
Clustal Consensus  *****
Primer forward     -----C AGGGTCTTCT CTCCTCAA-----
Clustal Consensus  * *****
Primer reverse     -----
Clustal Consensus  -----

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
      500      510      520      530      540      550      560
Camelus ferus      GTCCAGGGCA GGGCTGGGAG AGACTCCAAC ACCCATGAGA CGCTCTGCCC ACTTTCCTG TGACATTGAG
Camelus dromedarius GTCCAGGGCA GGGCTGGGAG AGACTCCAAC ACCCATGAGA CGCTCTGCCC ACTTTCCTG TGACATTGAG
Camelus bactrianus  GTCCAGGGCA GGGCTGGGAG AGACTCCAAC ACCCATGAGA CGCTCTGCCC ACTTTCCTG TGACATTGAG
Vicugna pacos      GTCCAGGGCA GGGCTGGGAG AGACTCCAAC ACCCATGAGA CACTCTGCCC GCTTTCCTG TAACATTGAG
Clustal Consensus  *****
Primer forward     -----
Clustal Consensus  -----
Primer reverse     -----AAC ACCCATGAGA CACTCT-----
Clustal Consensus  *** *****
  
```

**Figura 25.** Alineamiento del cebador *forward* y *reverse* para el gen *DPBI* en la familia *Camelidae*.



**Figura 26.** Análisis fisicoquímico del cebador *forward* para el gen *DPBI* usando Oligoanalyzer del IDT. A. Análisis *Hairpin*. B. Análisis tamaño, %G/C y temperatura de fusión (Tm). C. Análisis *self-dimer*.



**Figura 27.** Análisis fisicoquímico del cebador *reverse* para el gen *DPBI* usando Oligoanalyzer del IDT. A. Análisis *Hairpin*. B. Análisis tamaño, %G/C y temperatura de fusión (Tm). C. Análisis *self-dimer*.



A.

structure	Image	$\Delta G$ (kcal.mole <sup>-1</sup> )
1		-1.13

B.

SEQUENCE	5'- CGT GAT CTC AYR TCT CAC TAT G -3'		
COMPLEMENT	5'- CAT AGT GAG AYR TGA GAT CAC G -3'		
LENGTH	22		
GC CONTENT	45.5 %		
MELT TEMP RANGE	MIN	MEAN	MAX
	49.9°C	52.4°C	54.7°C

C.

**Dimer Sequence:**

5'- CGTGATCTCAYRTCTCACTATG -3'

**Maximum Delta G: -35.63 kcal/mole**

**Delta G: -8.48 kcal/mole Base Pairs: 5**

```

5'          CGTGATCTCAYRTCTCACTATG
           |||||  :::::
3' GTATCACTCTRYACTCTAGTGC
  
```

**Figura 30.** Análisis fisicoquímico del cebador *forward* para el gen *DQB1* usando Oligoanalyzer del IDT. A. Análisis *Hairpin*. B. Análisis tamaño, %G/C y temperatura de fusión (Tm). C. Análisis *self-dimer*.

A.

No structure was found for this sequence!

B.

SEQUENCE	5'- TCT CTT ACG CCA CTC CAC -3'
COMPLEMENT	5'- GTG GAG TGG CGT AAG AGA -3'
LENGTH	18
GC CONTENT	55.6 %
MELT TEMP	53.9°C

C.

**Dimer Sequence:**

5'- TCTCTTACGCCACTCCAC -3'

**Maximum Delta G: -33.25 kcal/mole**

**Delta G: -3.61 kcal/mole Base Pairs: 2**

```

5'   TCTCTTACGCCACTCCAC
      :  ||  :
3'   CACCTCACCGCATCTCT
  
```

**Figura 31.** Análisis fisicoquímico del cebador *reverse* para el gen *DQB1* usando Oligoanalyzer del IDT. A. Análisis *Hairpin*. B. Análisis tamaño, %G/C y temperatura de fusión (Tm). C. Análisis *self-dimer*.

Primary Sequence: 5'- CGTGATCTCAYRTCTCACTATG -3'  
 Secondary Sequence: 5'- TCTCTTACGCCACTCCAC -3'

Maximum Delta G: -35.63 kcal/mole

Delta G: -4.95 kcal/mole Base Pairs: 3

5'                   CGTGATCTCAYRTCTCACTATG  
                       ||| :  
 3' CACCTCACCGCATCTCT

**Figura 32.** Análisis *hetero-dimer* de los cebadores *forward* y *reverse* para el gen *DQB1* usando Oligoanalyzer del IDT.

```

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
          60          70          80          90          100
Camelus bactrianus  TGGGGTGCTT GTGCTGGTGC TTAGGGCCCC AGCGGAGCAG TGGGGTCTT
Camelus ferus      TGGGGTGCTT GTGCTGGTGC TTAGGGCGCC AGCGGAGCAG TGGGGTCTT
Camelus dromedarius TGGGGTGCTT GTGCTGGTGC TTAGGGCGCC AGCGGAGCAG TGGGGTCTT
Vicugna pacos      TGGGGTGCTT GTGCTGGTGC TTAGGGCGCC AGCGGAGCAG TGGGGTCTT
Clustal Consensus  *****
Primer Forward     -----CTT GTGCTGGTGC TTAGG-----
Clustal Consensus  *** *****
Primer Reverse     -----
Clustal Consensus  -----

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
          610         620         630         640         650         660
Camelus bactrianus  TATAATTAG GAAGGAGCTG AAAAAGGTGT TGTTGGGGAG ACAGTGCGTG ACTTCAGCAG
Camelus ferus      TATAATTAG GAAGGAGCTG AAAAAGGTGT TGTTGGGGAG ACAGTGCGTG ACTTCAGCAG
Camelus dromedarius TATAATTAG GAAGGAACTG AAAAAGGTGT TGTTGGGGAG ACAGTGCGTG ACTTCAGCAG
Vicugna pacos      TATAATTAG GAAGGGGCTG TAAAGGATGT TGTCAGGGAG ACAATGCGTG ACTTCAGCAG
Clustal Consensus  *****
Primer Forward     -----
Clustal Consensus  -----
Primer Reverse     -----GAG ACAATGCGTG ACTTCA-----
Clustal Consensus  *** ** *****

```

**Figura 33.** Alineamiento del cebador *forward* y *reverse* para el gen *DRB1* en la familia *Camelidae*.

A.

structure	Image	$\Delta G$ (kcal.mole <sup>-1</sup> )
1		-1.06

B.

SEQUENCE	5'- CTT GTG CTG GTG CTT AGG -3'
COMPLEMENT	5'- CCT AAG CAC CAG CAC AAG -3'
LENGTH	18
GC CONTENT	55.6 %
MELT TEMP	53.5 °C

C.

<b>Dimer Sequence:</b> 5'- CTTGTGCTGGTGCTTAGG -3' <b>Maximum Delta G: -34.16 kcal/mole</b>
<b>Delta G: -3.14 kcal/mole Base Pairs: 2</b> 5'            CTTGTGCTGGTGCTTAGG :          : 3' GGATTCGTGGTCGTGTTC

**Figura 34.** Análisis fisicoquímico del cebador *forward* para el gen *DRB1* usando Oligoanalyzer del IDT. A. Análisis *Hairpin*. B. Análisis tamaño, %G/C y temperatura de fusión (Tm). C. Análisis *self-dimer*.

A.

structure	Image	$\Delta G$ (kcal.mole <sup>-1</sup> )
1		0.63
2		0.71
3		0.74

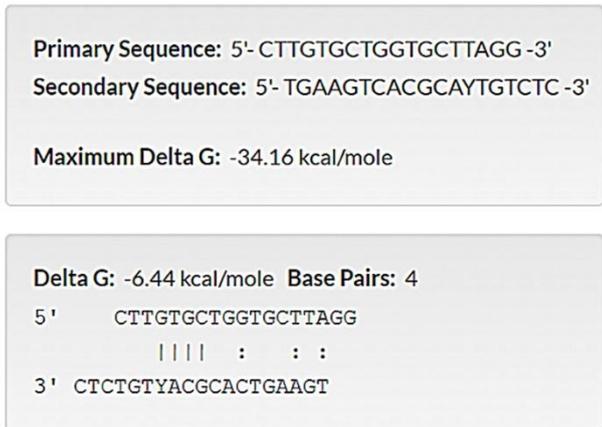
B.

SEQUENCE	5'- TGA AGT CAC GCA YTG TCT C -3'		
COMPLEMENT	5'- GAG ACA RTG CGT GAC TTC A -3'		
LENGTH	19		
GC CONTENT	50 %		
MELT TEMP RANGE	MIN	MEAN	MAX
	52.6 °C	53.7 °C	54.7 °C

C.

<b>Dimer Sequence:</b> 5'- TGAAGTCACGCAYTGCTC -3' <b>Maximum Delta G: -33.21 kcal/mole</b>
<b>Delta G: -3.61 kcal/mole Base Pairs: 2</b> 5'    TGAAGTCACGCAYTGCTC ::                  :: 3' CTCTGTYACGCACTGAAGT

**Figura 35.** Análisis fisicoquímico del cebador *reverse* para el gen *DRB1* usando Oligoanalyzer del IDT. A. Análisis *Hairpin*. B. Análisis tamaño, %G/C y temperatura de fusión (Tm). C. Análisis *self-dimer*.



**Figura 36.** Análisis *hetero-dimer* de los cebadores *forward* y *reverse* para el gen *DRB1* usando Oligoanalyzer del IDT.

En las Figuras 16, 17, 22, 23, 26, 27, 30, 31, 34 y 35, se visualiza la conformación, tamaño, temperatura de fusión ( $T_m$ ), valores  $\Delta G$ , estructuras diméricas y contenido G/C de los cebadores elaborados en este estudio. Mientras que en las Figuras 18, 24, 28, 32 y 36 se visualizan sus estructuras hetero-diméricas. El tamaño de los amplicones

Para el caso de los genes *TLR2* y *TLR4* los cebadores presentaron una especificidad del 100%, mientras que para el caso de los genes *DPB1*, *DQB1* y *DRB1* no presentaban una especificidad del 100% debido a que fueron elaborados cambiando algunas bases (máximo en 2) bajo la nomenclatura IUPAC (Tabla 4) con la finalidad que sean utilizados bajo cualquier estudio de estos genes dentro de la familia *Camelidae*. Sin embargo, esto en la práctica no es así ya que en la síntesis de los oligonucleótidos se elaboran todas las combinaciones posibles para estos casos. Esto hace que una de las combinaciones si sea 100% específica e incluso, al no ser una base distinta ya sea lejana al extremo 3' del cebador, aún es posible la unión del cebador a la secuencia flanqueante (Iserte et al., 2013). Para el gen *DPB1* se usó el código M (A/C) en una base para su cebador forward y el código Y (C/T) para una base de su cebador reverse. Para el gen *DQB1* se usaron los códigos Y (C/T) y R (A/G) en 2 bases de su cebador forward. Finalmente, para el gen *DRB1* se usó el código Y (C/T) en una base de su cebador forward.

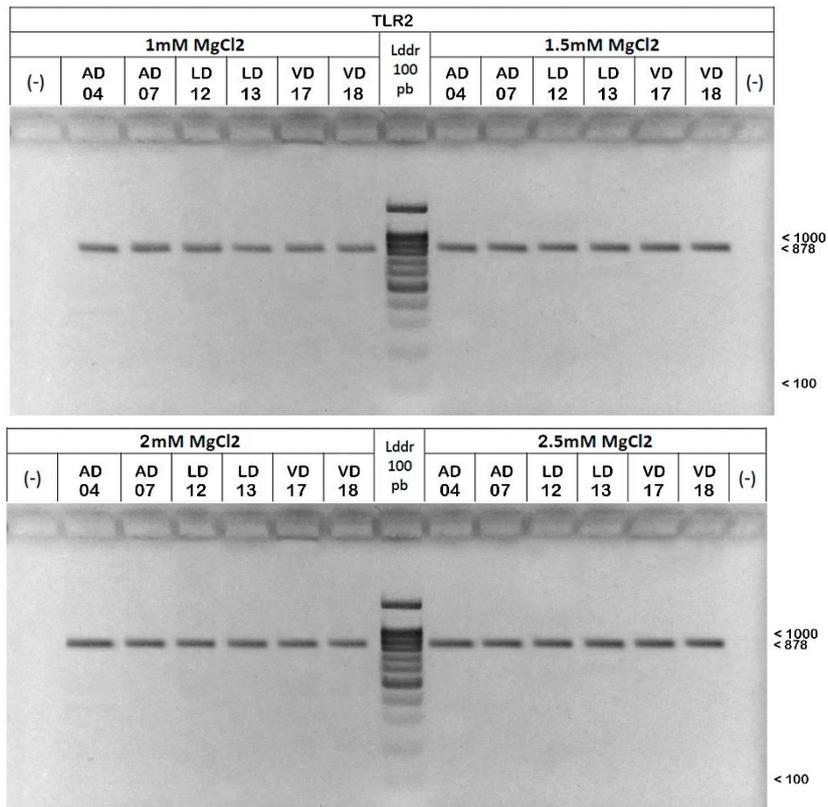
Usando la herramienta *in silico*-PCR de la Universidad de Santa Cruz de California, se comprobó que los cebadores para todos los genes evaluados eran específicos solo para las secuencias dianas y mas no para otras secuencias genómicas dentro de la misma especie o en otras especies distintas. Así mismo, se tuvo el mayor cuidado posible para que los

cebadores cumplieran con todos los criterios requeridos para ser excelentes candidatos a elegir. Los cebadores obtenidos en este estudio difieren de aquellos utilizados en trabajos previos como los de Guzmán (2011) y Montes et al. (2011) debido a que estos autores utilizaron cebadores provenientes de especies como bovinos y porcinos para sus investigaciones de los genes *TLR2* y *TLR4* en camélidos sudamericanos.

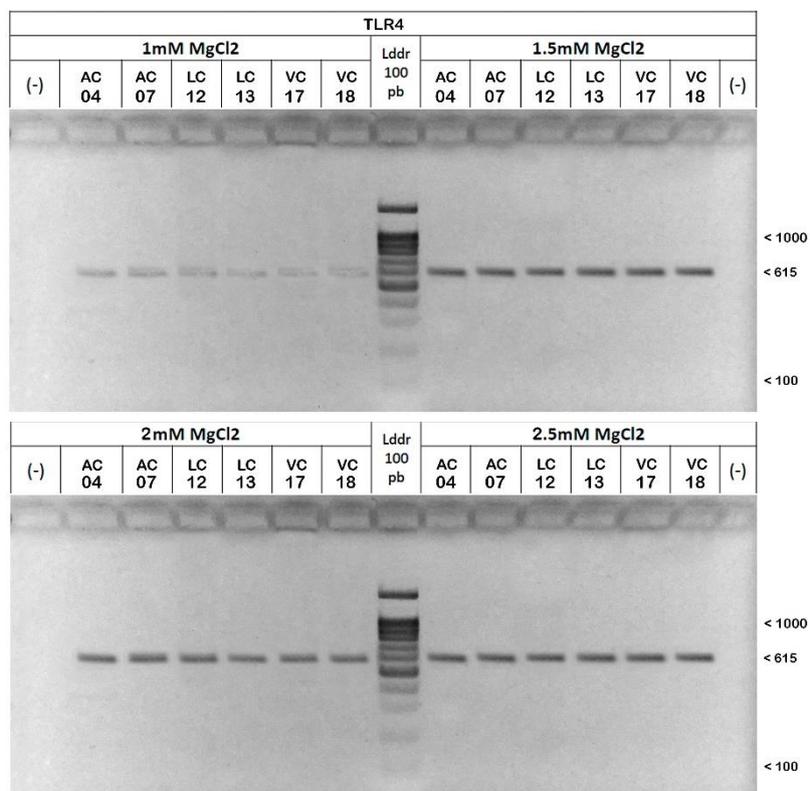
#### 4.2.2 Amplificación de los genes mediante PCR punto final

5µl de los amplicones fueron visualizados en geles de agarosa al 2.5% junto con el *Ladder* de 100bp RTU (GeneDireX) y un control negativo. La temperatura de *annealing* se estableció mediante un gradiente de temperatura dentro del rango de 50-60°C con intervalos de 2°C. Para los genes TLR se estandarizó una temperatura de *annealing* de 58°C mientras que para los genes del MHC una temperatura de 60°C para su *annealing* (imágenes no mostradas).

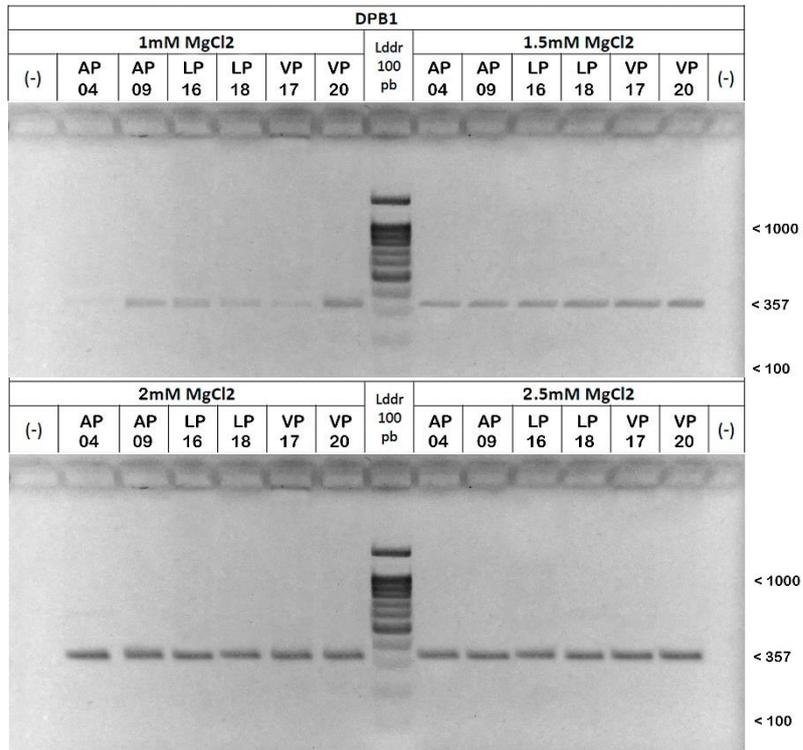
La estandarización de MgCl<sub>2</sub> se dio a concentraciones de 1mM, 1.5mM, 2mM y 2.5mM. Siendo establecida la concentración de 1.5mM como la óptima para el protocolo de la PCR (Figuras 37-41)



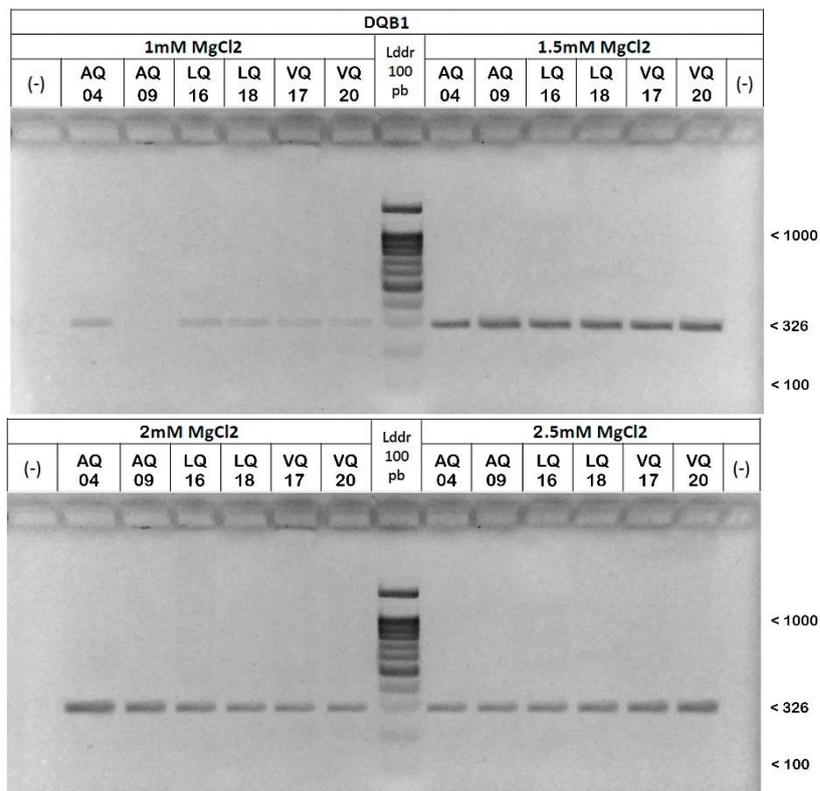
**Figura 37.** Amplificación de la región LRR del gen *TLR2*.



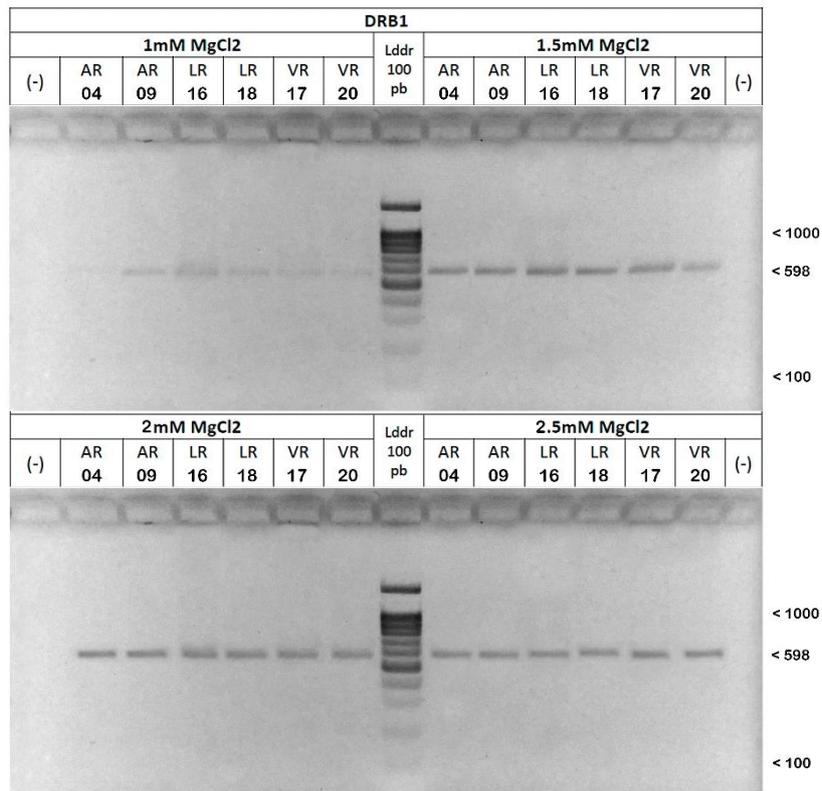
**Figura 38.** Amplificación de la región LRR del gen *TLR4*.



**Figura 39.** Amplificación del exón 2 en el gen *DPB1*.



**Figura 40.** Amplificación del exón 2 en el gen *DQB1*.



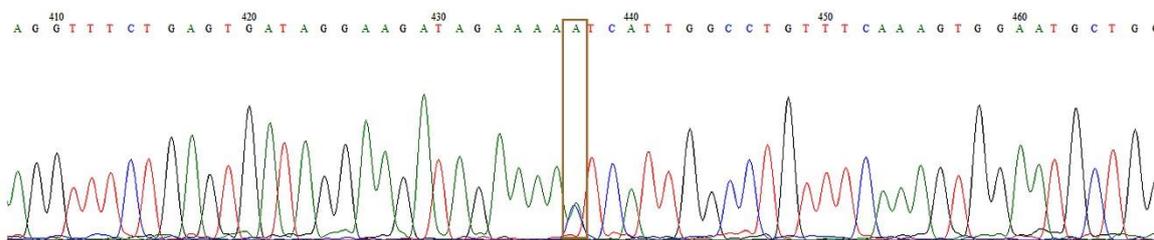
**Figura 41.** Amplificación del exón 2 en el gen *DRB1*.

Al término de las amplificaciones de cada gen, no fue posible realizar la cuantificación en el equipo Nanodrop™ (Thermo Fisher Scientific, Inc) para registrar las concentraciones de los amplicones obtenidos debido a problemas en la coordinación con el laboratorio encargado del análisis. Como protocolo opcional, se realizó un método cualitativo usando como referencia las intensidades de las bandas obtenidas en el *Ladder*. Cada banda del *Ladder* 100bp RTU (GeneDireX) presentan una concentración de ADN (ng/5µl) estándar como se registra en su manual de uso. Por lo que se estimó de manera visual, un aproximado de la concentración a la que se obtuvieron los productos de la amplificación con respecto a las intensidades de las bandas en el *Ladder*.

### 4.3 Secuenciamiento

Las secuencias fueron discernidas a elección del criterio de un buen resultado del electroferograma. Se descartaron a aquellas secuencias que presentaban ruido, baja intensidad de señal y aquellas más cortas de lo esperado.

Del total de las 90 muestras, se logró obtener el secuenciamiento de: 54 secuencias para el gen *TLR4* (provenientes de 18 alpacas, 18 llamas y 18 vicuñas), 49 secuencias para el gen *TLR2* (18 alpacas, 18 llamas y 13 vicuñas) y 20 secuencias para el gen *DRB1* (3 alpacas, 6 llamas y 11 vicuñas).



**Figura 42.** Electroferograma parcial en sentido *reverse* de una muestra para la secuencia *TLR4*. Se observa en la posición 437 un pico de heterocigosidad.

No fue posible obtener buenos resultados de las secuencias para los genes *DPB1* y *DQB1*. La mayoría de estos resultados fueron fallidos, por lo que no fue posible tener una muestra representativa para el análisis de estos genes. Entre los fallos más comunes que evita se dé un óptimo secuenciamiento están la baja concentración tanto de la muestra (ng/ $\mu$ l) como de los cebadores usados ( $\mu$ M) y la mala elaboración de los cebadores que generarían errores durante la unión a la secuencia (Genepool, 2009; McGrath, 2014; Eurofins Scientific, 2019; Nucleics, 2020; University of Nottingham, 2020).

Debido a que la concentración de los amplicones se realizó de manera cualitativa, no se supo a ciencia cierta los valores reales de dichas concentraciones. Esto deja un posible margen de error porque se requerían concentraciones pequeñas (10ng/ $\mu$ l) de los amplicones para su secuenciamiento. Por lo que este punto, pudo no satisfacer las concentraciones solicitadas y dar resultados nulos o picos de electroferogramas pequeños (Figura 42) debido a la baja intensidad de la señal.

Adicionalmente, el laboratorio MCLAB realizo un purificado previo de las muestras con el fin de poder retirar las impurezas presentes (cebadores no incorporados, dNTP sobrantes, sales y otros). Su método usa el kit MCMag PCR Purification (MCLAB), el cual utiliza etanol como solución de lavado. Con este método, los lavados durante la purificación generan pérdidas en la concentración de la muestra (Nucleics, 2020). Kemp et al. (2014) purifico muestras de ADN usando un kit comercial diferente (sin etanol) y registro perdidas muestréales promedió entre 21.75% y 60.56% (media, 39.03%). Esta información apoya la idea de la baja concentración de ADN usada como posible error durante el secuenciamiento.

Los cebadores que se usaron en el secuenciamiento fueron los mismos que se elaboraron, es decir que se usaron aquellos que eran degenerados. Los reportes de problemas durante el secuenciamiento de ADN mencionan la ineficiente unión del cebador. Si bien los cebadores elaborados son óptimos para la amplificación de los genes, estos no lo son para el secuenciamiento. Ya que las recomendaciones que hacen distintas entidades y autores es de usar cebadores con las secuencias requeridas para la óptima hibridación entre esta con la muestra y mas no el uso de cebadores con bases ambiguas para el secuenciamiento (Genepool, 2009; McGrath, 2014; Eurofins Scientific, 2019; Nucleics, 2020; University of Nottingham, 2020). Esto debido a que cebadores degenerados y aquellos con bases no coincidentes, mostrarán una menor eficiencia de hibridación debido a la reducción de la estabilidad de unión del cebador y si se producen degeneraciones en o cerca del extremo 3', es muy probable que su intento de secuenciación falle (University of Nottingham, 2020). Como los cebadores para el gen *DPBI* eran degenerados tanto en su sentido forward como reverse y el cebador forward para *DQBI* era degenerado en dos bases, estos habrían generado errores que no permitieron el correcto secuenciamiento de las muestras.

#### **4.4 Reconstrucción de haplotipos**

Se identificaron en todas las secuencias obtenidas los picos de heterocigosidad presentes dentro de las secuencias de interés, para posteriormente registrar las bases correspondientes y su posición dentro de la secuencia.

Para el caso del gen *TLR2*, se registraron 14 sitios polimórficos (SNPs) dentro de los camélidos sudamericanos. Para el gen *TLR4* solo 3 sitios polimórficos y para el gen *DRBI* 8 sitios polimórficos. En la Tabla 8 se muestran los sitios identificados al comparar las secuencias obtenidas con la secuencia de referencia del GeneBank en el NCBI.

**Tabla 8: Identificación de sitios polimórficos en las repeticiones ricas en leucinas de los genes *TLR2* y *TLR4* y en el exón 2 del gen *DRB1* en tres especies de camélidos sudamericanos**

Gen	Nucleótido		Frecuencia (%) <sup>b</sup>		
	Sitio	Alelo <sup>a</sup>	Alpaca (n=18)	Llama (n=18)	Vicuña (n=13)
TLR2	18	C/T	0.0	0.0	7.7
	23	C/T	0.0	22.2	0.0
	66	C/T	33.3	11.1	76.9
	107	G/A	0.0	0.0	38.5
	175	A/C	0.0	0.0	7.7
	207	G/A	16.7	33.3	0.0
	242	G/C	66.7	5.6	53.9
	256	C/G	22.2	11.1	84.6
	395	C/T	11.1	88.9	0.0
	416	C/T	55.6	5.6	61.5
	440	G/A	66.7	88.9	69.2
	462	G/A	11.1	88.9	0.0
	470	A/G	11.1	0.0	38.5
	481	G/A	72.2	5.6	61.5
			Alpaca (n=18)	Llama (n=18)	Vicuña (n=18)
TLR4	117	T/G	5.6	50.0	0.0
	298	A/G	0.0	0.0	5.6
	421	G/A	38.9	88.9	0.0
			Alpaca (n=3)	Llama (n=6)	Vicuña (n=11)
DRB1	44	C/T	0.0	0.0	9.1
	56	G/A	33.3	16.7	45.5
	117	G/A	33.3	0.0	0.0

Continuación...

132	G/T	0.0	0.0	18.2
134	A/G	33.3	50.0	45.5
155	G/A	66.7	50.0	36.4
236	T/C	33.3	33.3	36.4
268	G/A	0.0	0.0	36.4

*Nota:* n= número de individuos de cada especie. <sup>a</sup>Alelo de referencia del GeneBank (izquierda)/alelo distinto identificado en las secuencias (derecha). <sup>b</sup>Se indica la frecuencia porcentual del segundo alelo.

Para cada especie de camélido se detectaron 10 polimorfismos para la región LRR el gen *TLR2*. Se puede observar que, las vicuñas presentan una mayor frecuencia para los SNPs de la posición 18, 66, 107, 175, 256, 416, 440, 470 y 481. Estos SNPs representan el 64.3% del total detectado. Estas frecuencias, podrían ser mayores para estas posiciones; o para otras, en el caso de tener la misma cantidad de individuos.

Un panorama distinto se observa en la región LRR del gen *TLR4*. En esta secuencia, las llamas y alpacas presentan 2 de los 3 sitios detectados (posición 117 y 421) y siendo las llamas las que presentaban la mayor frecuencia para dichos sitios. Mientras que para el caso de las vicuñas solo se observó la presencia de un único sitio polimórfico (posición 298) en un solo animal y que dicho sitio no se detectó ni en alpacas ni en llamas. No hubo errores al detectar este SNP dentro del individuo número 13 en vicuñas, ya que su secuenciamiento no presentaba ruido, baja intensidad u otro error que pudiera descartar su inclusión dentro de la muestra representativa.

Para el caso del gen *DRB1* se detectaron 8 sitios polimórficos de los cuales 5 son de alpaca, 4 de llama y 7 de vicuña. Se puede observar que, las vicuñas presentan una mayor frecuencia para los SNPs de la posición 44, 56, 132, 233 y 268. Estos SNPs representan el 62.5% del total detectado. En este análisis las vicuñas están más sobrerrepresentadas por lo que es entendible que la frecuencia de los SNP sea mayor.

Luego de pasar los sitios polimórficos a código binario para ser utilizados dentro del programa PHASE v2.1.1, se obtuvieron los haplotipos más probables. Para el caso del gen *TLR2* se obtuvieron 25 haplotipos diferentes, para el gen *TLR4* 5 haplotipos y para el gen *DRB1* 10 haplotipos (Tabla 9-11).

Al ser secuencias de origen nuclear, el programa nos da las dos secuencias alélicas de los parentales más probables de cada individuo. Por ende, a partir de este punto se trabajaron con 108 secuencias para el gen *TLR4* (36 secuencias de alpacas, 36 para llamas y 36 para vicuñas), 98 secuencias para el gen *TLR2* (36 de alpacas, 36 de llamas y 26 de vicuñas) y 40 secuencias para el gen *DRB1* (6 de alpacas, 12 de llamas y 22 de vicuñas) como se observa en el Anexo 2-4.

**Tabla 9: Lista de haplotipos más probables en la región LRR para el gen *TLR2* dentro de las 3 especies de camélidos sudamericanos**

Gen	SNP	Haplotipo																								
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25
TLR2	18C>T	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	T	T	C	C	C	C	C
	23C>T	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	T	T	C	C	C	C	C	C	C	C	C
	66C>T	C	C	T	C	C	C	T	T	C	T	T	C	C	C	T	C	C	T	T	T	T	C	T	C	T
	107G>A	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	A	A	G	G	G
	175A>C	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	C	C	A	A	A	A	A
	207G>A	G	A	G	A	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	A	G	A	G	G	G	G	G	G	G	G
	242G>C	C	G	G	G	G	G	C	G	C	C	G	C	G	G	G	G	G	G	G	G	C	G	C	G	G
	256C>G	C	C	C	C	C	C	G	C	C	C	G	C	C	C	C	C	C	C	G	G	C	C	C	G	G
	395C>T	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	T	T	C	T	C	T	C	C	C	C	C	C	C
	416C>T	T	C	C	C	C	C	T	C	T	C	C	C	C	C	C	C	C	C	T	C	T	C	T	C	T
	440G>A	A	G	G	G	G	G	A	G	A	A	G	A	A	A	G	A	G	A	A	A	A	A	A	G	G
	462G>A	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	A	A	G	A	G	A	G	G	G	G	G	G	G
	470A>G	A	A	A	A	A	A	A	A	G	A	A	A	A	A	A	A	A	A	G	G	A	A	G	A	A
481G>A	A	G	A	A	A	G	A	G	A	A	G	A	G	A	G	G	G	G	A	G	A	G	A	G	G	

**Tabla 10: Lista de haplotipos más probables en la región LRR para el gen *TLR4* dentro de las 3 especies de camélidos sudamericanos**

Gen	SNP	Haplotipo				
		1	2	3	4	5
TLR4	117T>G	T	T	G	G	T
	298A>G	A	A	A	A	G
	421G>A	G	A	G	A	G

**Tabla 11: Lista de haplotipos más probables para el exón 2 del gen *DRB1* dentro de las 3 especies de camélidos sudamericanos**

Gen	SNP	Haplotipo									
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
DRB1	44C>T	C	C	C	C	C	C	C	C	T	T
	56G>A	G	G	G	A	G	G	G	G	G	A
	117G>A	A	G	G	G	G	G	G	G	G	G
	132G>T	G	G	G	G	G	G	T	G	G	G
	134A>G	A	A	A	G	G	G	A	A	A	G
	155G>A	G	G	A	G	G	G	G	G	A	G
	236T>C	T	T	T	C	C	T	T	T	T	T
	268G>A	G	G	G	G	G	G	G	A	G	G

#### 4.5 Diversidad molecular

Los resultados del consenso en el alineamiento múltiple (*Clustal consensus*) para cada gen, muestran un elevado estado de conservación (Anexos 4-6)

En la Tabla 12, se observa la identidad obtenida a partir de la herramienta Blastn del NCBI para las secuencias. Al ser secuencias muy conservadas, solo se usó una secuencia de cada especie como referencia para determinar su identidad.

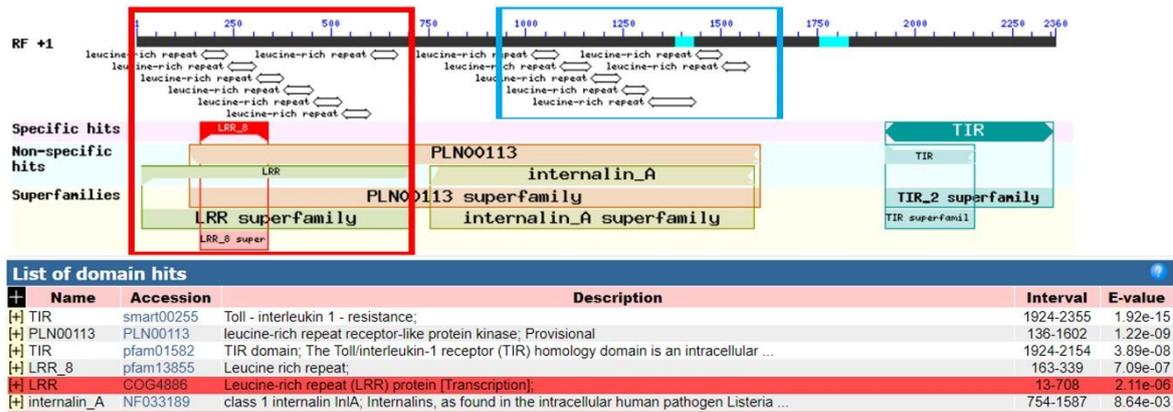
**Tabla 12: BLAST obtenido al comparar las secuencias resultantes con las secuencias de referencias en el GeneBank**

Gen	Individuo <sup>a</sup>	Acierto más próximo	% de identidad	Número de accesoión
TLR2 LRR	AD1	<i>Vicugna pacos</i> toll like receptor 2 ( <i>TLR2</i> ), transcript variant X1, mRNA	99.43	XM_015246997.2
	LD1	<i>Vicugna pacos</i> toll like receptor 2 ( <i>TLR2</i> ), transcript variant X1, mRNA	100	XM_015246997.2
	VD2	<i>Vicugna pacos</i> toll like receptor 2 ( <i>TLR2</i> ), transcript variant X1, mRNA	99.86	XM_015246997.2
TLR4 LRR	AC1	<i>Vicugna pacos</i> toll like receptor 4 ( <i>TLR4</i> ), transcript variant X1, mRNA	100	XM_006211381.3
	LC2	<i>Vicugna pacos</i> toll like receptor 4 ( <i>TLR4</i> ), transcript variant X1, mRNA	100	XM_006211381.3
	VC1	<i>Vicugna pacos</i> toll like receptor 4 ( <i>TLR4</i> ), transcript variant X1, mRNA	100	XM_006211381.3
DRB1 Exón 2	AR4	<i>Vicugna pacos</i> rano class II histocompatibility antigen, A beta chain-like (LOC102533644), mRNA	99.63	XM_031688335.1
	LR7	<i>Camelus ferus</i> MHC class II antigen (Cafe-DRB) gene, Cafe-DRB*02 allele, exon 2 and partial cds	99.63	KT936406.1
	VR4	<i>Vicugna pacos</i> rano class II histocompatibility antigen, A beta chain-like (LOC102533644), mRNA	99.63	XM_031688335.1

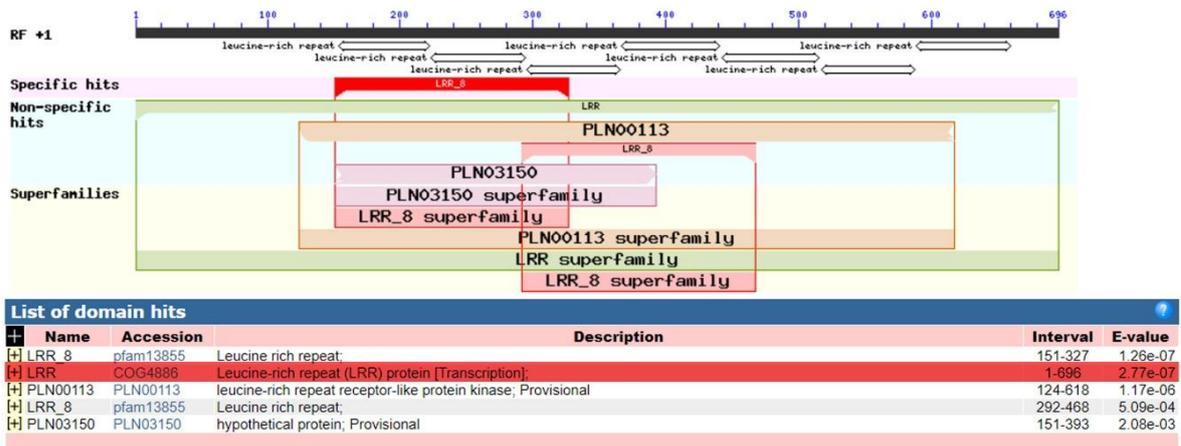
<sup>a</sup>A: alpaca; L: llama; V: vicuña; D: *TLR2*; C: *TLR4*; R: *DRB1*; Número: registro del animal

Para comprobar si amplificamos la región LRR correcta ya que como se muestra en la Figura 43, el gen *TLR2* presenta dos grandes repeticiones ricas en leucinas. Siendo la región marcada en rojo aquella que se registra como LRR.

Haciendo uso de la herramienta blastx del NCBI, se tradujo la secuencia de referencia para el gen *TLR2*. Constatando así; como se muestra en la Figura 44, que las secuencias obtenidas son para la región LRR del gen *TLR2*. En ambas figuras se puede visualizar las 7 repeticiones ricas en leucinas analizadas.

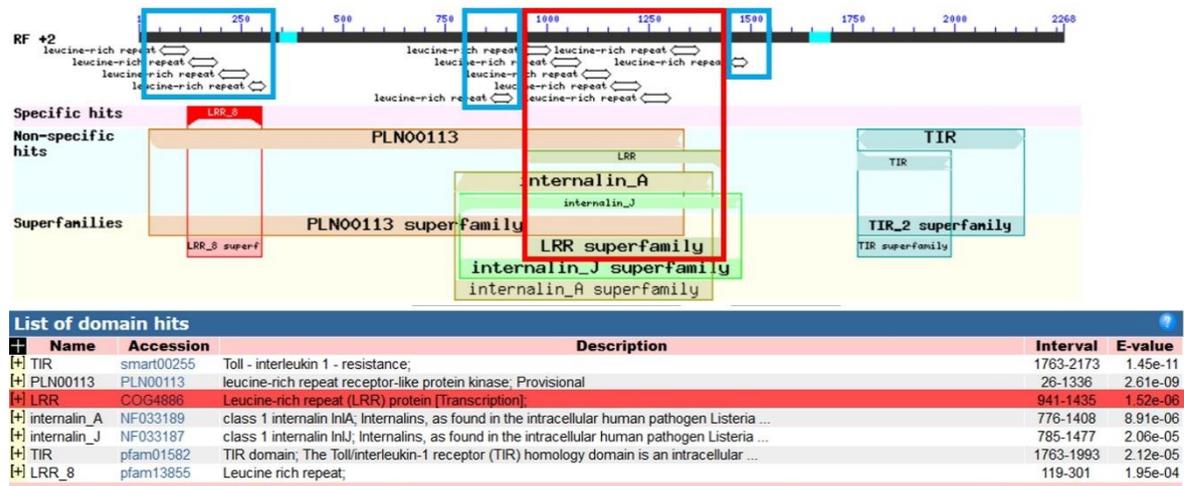


**Figura 43.** Gen *TLR2* de *Vicugna pacos* registrado en el GeneBank. La zona marcada en rojo indica la región rica en leucinas. La zona marcada en azul no fue considerada en este estudio. La fila resaltada en rojo dentro del cuadro indica el nombre, número de accesoión, descripción, el inicio y fin de la región LRR dentro del gen *TLR2*.

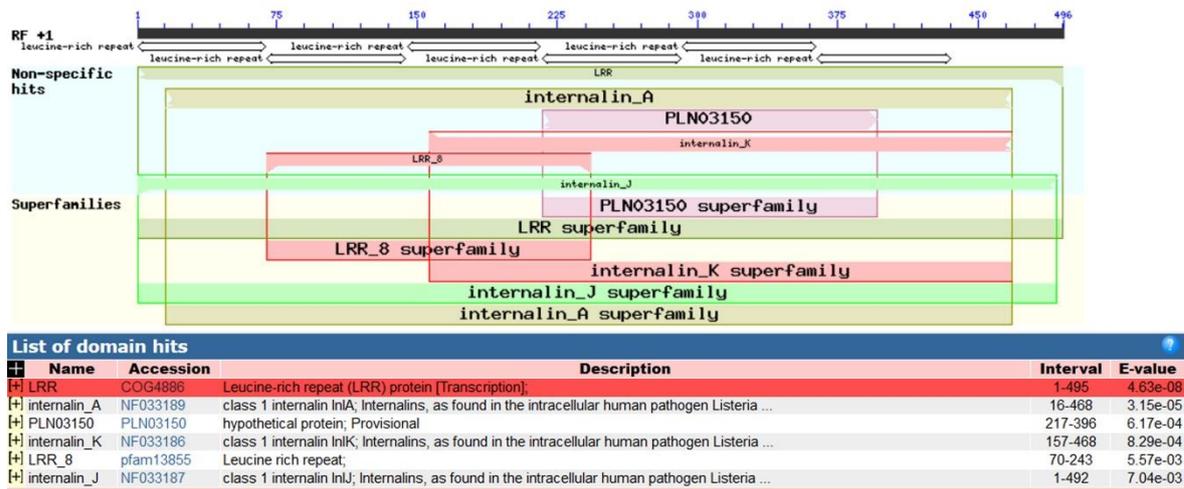


**Figura 44.** Región LRR para el gen *TLR2* amplificada y secuenciada en este estudio. La fila resaltada en rojo dentro del cuadro indica el nombre, número de accesoión, descripción, el inicio y fin de la región LRR.

La misma metodología se utilizó para corroborar la correcta amplificación de la región LRR del gen *TLR4*. En la Figura 45 se muestran las distintas repeticiones ricas en leucinas, siendo primordial la región LRR marcada en rojo. La Figura 46 corrobora la región amplificada mostrando las 6 repeticiones ricas en leucinas dentro de la región LRR.

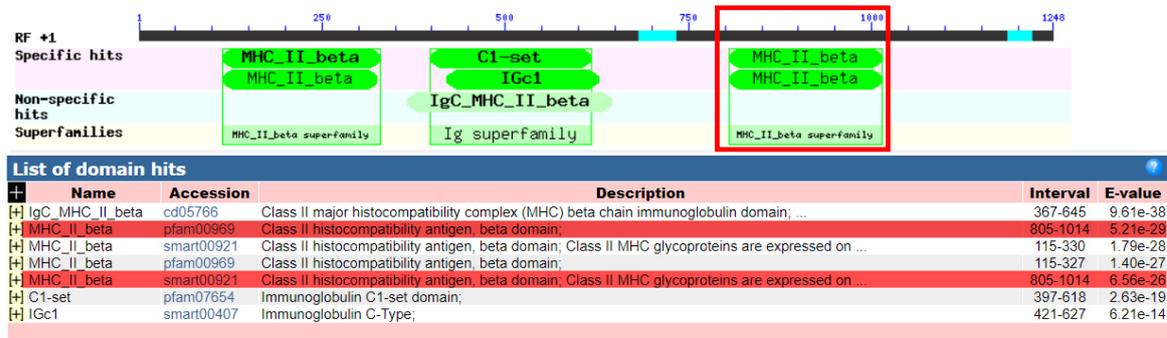


**Figura 45.** Gen *TLR4* de *Vicugna pacos* registrado en el GeneBank. La zona marcada en rojo indica la región rica en leucinas. Las zonas marcadas en azul no fueron consideradas en este estudio. La fila resaltada en rojo dentro del cuadro indica el nombre, número de accesoión, descripción, el inicio y fin de la región LRR dentro del gen *TLR4*.

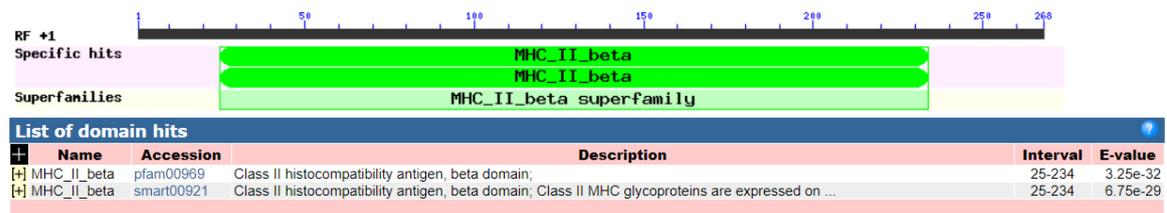


**Figura 46.** Región LRR para el gen *TLR4* amplificada y secuenciada en este estudio. La fila resaltada en rojo dentro del cuadro indica el nombre, número de accesoión, descripción, el inicio y fin de la región LRR.

Se repitió la metodología la para el gen *DRB1*. En esta secuencia fue indispensable la amplificación del exón número 2. Como se muestra en la Figura 47, se visualizan dos regiones de igual nombre (uno al inicio de la secuencia y el segundo casi al final) en la secuencia de referencia MHC-DRB de *Vicugna pacos*, siendo la zona marcada en rojo la correspondiente al exón número 2. Por ende, esta sección del gen es la de interés para amplificar y analizar. El alineamiento de la secuencia amplificada con la secuencia de referencia MHC-DRB1 (número de accesoión XM\_031688335.1) nos da la certeza de haber amplificado la región correcta. Se confirma aún más cuando se traduce la secuencia (Figura 48).



**Figura 47.** Gen *DRB1* de *Vicugna pacos* registrado en el GeneBank. La zona marcada en rojo indica la ubicación del exón número 2. La fila resaltada en rojo dentro del cuadro indica el nombre, número de accesoión, descripción, el inicio y fin de la secuencia.



**Figura 48.** Exón número 2 del gen *DRB1* amplificado y secuenciado en este estudio. El cuadro indica el nombre, número de accesoión, descripción, el inicio y fin de la secuencia.

**Tabla 13: Caracterización molecular de las repeticiones ricas en leucinas de los genes TLR2 y TLR4 y del exón 2 DRB1 en las tres especies de camélidos sudamericanos**

Gen	Datos Moleculares	Alpaca	Llama	Vicuña	
TLR2	Número de secuencias (n)	36	36	26	
	Número de sitios polimórficos (S)	10	10	10	
	Número de sitios informativos	10	7	10	
	Número de sitios singletons	0	3	0	
	Número de transiciones (Ts)	8	8	7	
	Número de transversiones (Tv)	2	2	3	
	Número de indels	0	0	0	
	Composición nucleotídica (valores relativos)	C	25.37%	25.32%	25.26%
		T	27.40%	27.41%	27.47%
		A	24.01%	24.03%	23.94%
G		23.22%	23.25%	23.33%	
TLR4	Número de secuencias (n)	36	36	36	
	Número de sitios polimórficos (S)	2	2	1	
	Número de sitios informativos	1	2	0	
	Número de sitios singletons	1	0	1	
	Número de transiciones (Ts)	1	1	1	
	Número de transversiones (Tv)	1	1	0	
	Número de indels	0	0	0	
	Composición nucleotídica (valores relativos)	C	26.06%	26.06%	26.06%
		T	29.89%	29.85%	29.90%
		A	27.92%	28.00%	27.87%
G		16.12%	16.09%	16.17%	
DRB1	Número de secuencias (n)	6	12	22	
	Número de sitios polimórficos (S)	5	4	7	
	Número de sitios informativos	2	3	7	
	Número de sitios singletons	3	1	0	
	Número de transiciones (Ts)	5	4	6	
	Número de transversiones (Tv)	0	0	1	
	Número de indels	0	0	0	
	Composición nucleotídica (valores relativos)	C	20.21%	20.24%	20.22%
		T	20.83%	20.80%	20.88%
		A	24.50%	24.32%	24.44%
G		34.45%	34.64%	34.46%	

Para la región LRR del gen *TLR2*, el programa Arlequín v3.5.2.2 corroboró lo que en primera instancia solo fue un conteo visual de los 10 sitios polimórficos correspondientes para cada especie de camélidos (Tabla 8). Para el caso de las alpacas, de sus 10 sitios polimórficos todos resultaron ser informativos. Además, se observa que presenta 8 transiciones y 2 transversiones. En las llamas, de sus 10 sitios polimórficos 7 resultaron informativos y 3 fueron sitios *singleton*. Estos animales presentaron el mismo número tanto de transiciones como de transversiones observados en alpacas. Para las vicuñas todos sus sitios polimórficos fueron informativos, además de presentar 7 transiciones y 3 transversiones. Para ningún caso se registró la presencia de *indels*. En cuanto a la composición nucleotídica de las secuencias, se observa que hay una distribución casi homogénea entre las 4 bases nucleotídicas para todas las especies. Se aprecia un mayor porcentaje de Timina ( $\approx 47.43\%$  promedio total) y un relativo bajo porcentaje de Guanina ( $\approx 23.27\%$  promedio total). Todos los datos mencionados se observan en la Tabla 13.

En la región LRR del gen *TLR4*, se observan los dos sitios polimórficos tanto para alpaca como para llamas y el único sitio polimórfico identificado para vicuñas previamente registrados (Tabla 8). Para las alpacas se observa que de sus dos sitios polimórficos uno es informativo y el otro *singleton*. Además de presentar una transversión y una transición en sus secuencias. Para el caso de las llamas, todos sus sitios polimórficos fueron informativos y al igual que en las alpacas presentó una transversión y una transición. En las vicuñas, su único sitio polimórfico resultó *singleton* además de presentar una única transición. Para ningún caso se registró la presencia de *indels*. En la composición nucleotídica de estas secuencias para todas las especies, se observa que presentan un bajo porcentaje de Guanina ( $\approx 16.13\%$  promedio total) mientras que para el resto de los nucleótidos el porcentaje es casi homogéneo. Los datos mencionados anteriormente se visualizan en la Tabla 13.

Finalmente, para el caso del gen *DRBI* se ratifica la presencia de: 5 sitios polimórficos para alpacas, 4 para llamas y 7 para vicuñas. En alpacas, de sus 5 sitios polimórficos 2 resultaron ser informativos y 3 *singletons*. Además, presentaron 5 transiciones y cero transversiones. De los 4 sitios polimórficos en llamas, 3 resultaron en sitios informativos y un *singleton*. Se observa además la presencia de 4 transiciones en estos animales. Para el grupo de vicuñas, todos sus sitios polimórficos resultaron en sitios informativos de los cuales 6 fueron transiciones y una transversión. Para ningún caso se registró la presencia de *indels*. En la composición nucleotídica de estas secuencias para todas

las especies, se observa un alto porcentaje de Guanina ( $\approx 34.52\%$  promedio total) y porcentaje casi homogéneo de Citosina y Timina (Tabla 13).

Estos resultados obtenidos y analizados tanto para la región LLR de los genes *TLR2* y *TLR4* y para el exón 2 del gen *DRB1*, son los primeros que se realizan en las tres especies de camélidos sudamericanos. El estudio de Guzmán (2011), reporta 2 sitios polimórficos para el gen *TLR4*. Sin embargo, estos polimorfismos no pudieron ser comparados con los hallados en este estudio. Esto debido a que los 2 sitios se encuentran fuera de la región LRR; más específicamente, a la derecha (marcada de azul) de la región marcada en rojo en la Figura 45. Otro estudio hecho por Montes et al. (2011) determinó la presencia de 3 SNP en el gen *TLR2*. Sin embargo; y al igual que en el estudio de Guzmán (2011), sus secuencias estaban fuera de la región LRR. Por tal motivo no fue posible comparar similitud (en el caso lo hubiera) de los sitios polimórficos hallados en este estudio con los identificados por dichos autores.

No existen más registros de estudios previos de sitios polimórficos para las secuencias analizadas en este trabajo en camélidos sudamericanos. Sin embargo; y debido a su alto estado de conservación, es posible realizar inferencias con resultados obtenidos en camélidos del viejo mundo.

Dahiya et al. (2014), secuenció el gen *TLR2* completo para *Camelus dromedarius* y *Camelus bactrianus*. Utilizando sus datos, se realizó una comparación (mediante alineamiento múltiple) entre sus secuencias del gen de camélidos del viejo mundo con las secuencias de camélidos del nuevo mundo de este estudio. Se evidenciaron cambios nucleotídicos en otros sitios dentro de la secuencia LRR a parte de los determinados en este trabajo. En dromedarios, las posiciones 56T>C, 205C>T y 357C>A presentan dichos cambios en comparación con las secuencias de los camélidos sudamericanos. En camellos bactrianos las posiciones 86C>T, 480C>T, 559G>A y 608A>G son las que presentaban cambios al compararlas con las secuencias de los camélidos sudamericanos. Finalmente, tanto en dromedarios como en bactrianos presentaban cambios en la región LRR al compararlos con los camélidos sudamericanos en las posiciones 24 G>A, 108C>T, 172A>G, 179G>A, 264T>A, 340G>C, 382G>T, 575A>G, 628T>C, 633G>A y 664A>G.

Se han identificado 6 SNP en el exón 2 del gen *DRB1* para los camélidos del viejo mundo (*Camelus dromedarius*, *Camelus bactrianus* y *Camelus ferus*) (Plasil et al., 2016). Dicha

investigación también identifico los polimorfismos de la posición 155G>A y 236T>C que se hallaron en camélidos sudamericanos en este estudio.

En camélidos del viejo mundo, la región MHC está estructurada de manera similar a otras especies de mamíferos. Incluso, la diversidad de sus genes MHC de clase I y II es generalmente menor de lo esperado. Esto debido a que existe una baja diversidad nuclear en todo el genoma de dromedarios, camellos bactrianos salvajes y domésticos (Fitak et al., 2016). Esto puede deberse a varios cuellos de botella sufridos en la historia evolutiva de las tres especies. Pero también en tiempos recientes y debido a la domesticación de dromedarios y camellos bactrianos; o la caza y el deterioro de su hábitat, podrían ser responsables de la reducida variabilidad inmunogenética y genómica en los camélidos del viejo mundo (Cicarese et al., 2019). Sin embargo, todavía falta evidencia experimental para responder a la pregunta de si la baja diversidad de MHC se debe realmente a la baja diversidad de los genomas de los camellos (Cicarese et al., 2019).

Por tal motivo, es posible realizar una inferencia de resultados e inclusive de las conclusiones obtenidas para los análisis genómicos de camélidos del viejo mundo en los camélidos sudamericanos. Incluso, estudios realizados por Richardson et al. (2019) para los genes de la región MHC de clase II, demostraron la similitud en la organización y distancia dentro del cromosoma 20 entre camellos y alpacas, reforzando así la primera idea planteada.

#### **4.6 Diversidad genética**

Todos los resultados mencionados líneas abajo para los parámetros de la diversidad genética pueden ser visualizados en la Tabla 14.

Los resultados en la región LRR del gen *TLR2* muestran que no hay una mayor cantidad de SNPs en ninguna especie de camélido sudamericano. Todo lo contrario, ya que se halló la misma cantidad de polimorfismos en todas las especies ( $S=10$ ) aun cuando el número de individuos analizados en vicuñas fue menor ( $n=26$ ). Las alpacas presentaron un mayor número de haplotipos ( $h=15$ ). Sin embargo y en comparación con las llamas, son las vicuñas quienes presentan un mayor número de haplotipos ( $h=11$ ) aun presentando un menor número de secuencias incluidas en el análisis. La diversidad haplotípica ( $H_d$ ) resulto muy alta para todas las especies. El mayor resultado se obtuvo en alpacas ( $H_d=0.906$ ), debido a que la diversidad haplotípica es directamente proporcional con la cantidad de haplotipos presentes

en la población. No obstante, estos valores no son significativamente más altos que en llamas o vicuñas ya que la diferencia resulto ser mínima. En cuanto a la diversidad nucleotídica ( $\pi$ ), estimador de Watterson ( $\theta_w$ ) y promedio de diferencias nucleotídicas ( $k$ ), fueron las vicuñas las que presentaron un mayor valor ( $\pi=0.00527$ ,  $\theta_w=0.00377$  y  $k=3.66769$  respectivamente). Los resultados de la diversidad nucleotídica muestran que todos los nucleótidos son prácticamente iguales dentro de la secuencia al presentar valores cercanos a cero en todas las especies. Apoyando la idea que las secuencias entre los camélidos son altamente conservadas.

En el caso del análisis para la región LRR del gen *TLR4*, los resultados son más comparables al ser equitativo el tamaño muestral ( $n=36$ ). Para estas secuencias, las vicuñas presentaron un menor número de polimorfismos ( $S=1$ ) y una menor cantidad de haplotipos ( $h=2$ ). Sin embargo, los resultados para los demás parámetros genéticos evaluados elucidaron que las llamas presentan mayores valores. Estos resultados en llamas fueron:  $H_d=0.697$ ,  $\pi=0.001789$ ,  $\theta_w=0.00097$  y  $k=0.885714$ . Las vicuñas fueron las que presentaron los resultados más bajos de los parámetros de diversidad genética, incluso es la especie que tiene un muy bajo valor en su diversidad haplotípica ( $H_d=0.056$ ). Al igual que los resultados obtenidos de la diversidad nucleotídica ( $\pi$ ) en la región LRR del gen *TLR2*, mostraron que las secuencias para la región LRR del gen *TLR4* presentan casi los mismos nucleótidos.

Para el gen *DRB1*, los resultados muestran una mayor cantidad de polimorfismos para las vicuñas ( $S=7$ ). Sin embargo; y al estar las alpacas en menor proporción con respecto a las vicuñas, estas presentan un número de polimorfismos ( $S=5$ ) muy cercanos al de las vicuñas. En cuanto al número de haplotipos, las vicuñas son las que tienen el mayor valor ( $h=7$ ). Pero al analizar la diversidad haplotípica ( $H_d$ ) se observa que las alpacas presentan un mayor valor ( $H_d=0.867$ ), esto debido a que casi todas las secuencias analizadas en alpacas eran un haplotipo distinto. Si las frecuencias de los haplotipos son casi equitativas, la diversidad haplotípica será alta. Pero si un haplotipo en particular es predominante en una población, se espera que la diversidad haplotípica sea baja (Barahona Padilla, 2014). Analizando la diversidad nucleotídica de las tres especies se observa que todos los resultados presentan valores muy bajos (cercanos a cero). Pero de entre los tres resultados obtenidos, las vicuñas presentan un mayor valor en la diversidad nucleotídica ( $\pi=0.00943$ ). Barahona (2014) menciona que la diversidad nucleotídica ( $\pi$ ) depende tanto de las frecuencias de los haplotipos como del número de diferencias que lo distinguen entre ellos, por lo que está directamente relacionado al número de sitios polimórficos ( $S$ ). A mayor cantidad de sitios

polimórficos presentes en una población, mayor será el número de diferencia a pares entre sus haplotipos, por lo que la diversidad nucleotídica ( $\pi$ ) también será mayor. En este estudio, se esperaba que los resultados para el estimador de Watterson ( $\theta_w$ ) y el promedio de diferencias nucleotídicas ( $k$ ) presenten valores elevados dentro del análisis del gen *DRB1* en las vicuñas. Sin embargo, solo el parámetro ( $k$ ) resultó en un mayor valor para dicha especie. Quienes obtuvieron un mayor valor para el estimador de Watterson ( $\theta_w=0.00817$ ) fueron las alpacas y esto debido a que, al tener un alto número de polimorfismos dentro de un bajo número de secuencias, el parámetro ( $\theta_w$ ) presentara un valor elevado.

Bajo estos resultados obtenidos se puede argumentar que para el análisis de la región LRR del gen *TLR2*, las vicuñas presentan una ligera mayor variabilidad que el resto de las especies de camélidos sudamericanos evaluados. No obstante, esto no se ve reflejado en el análisis de la región LRR del gen *TLR4* donde las llamas presentan la mayor variabilidad de entre las tres especies. Finalmente, los resultados obtenidos en el análisis del exón 2 para el gen *DRB1* no permiten esclarecer de manera concisa si cierta especie presenta; o no, mayor variabilidad en comparación con el resto.

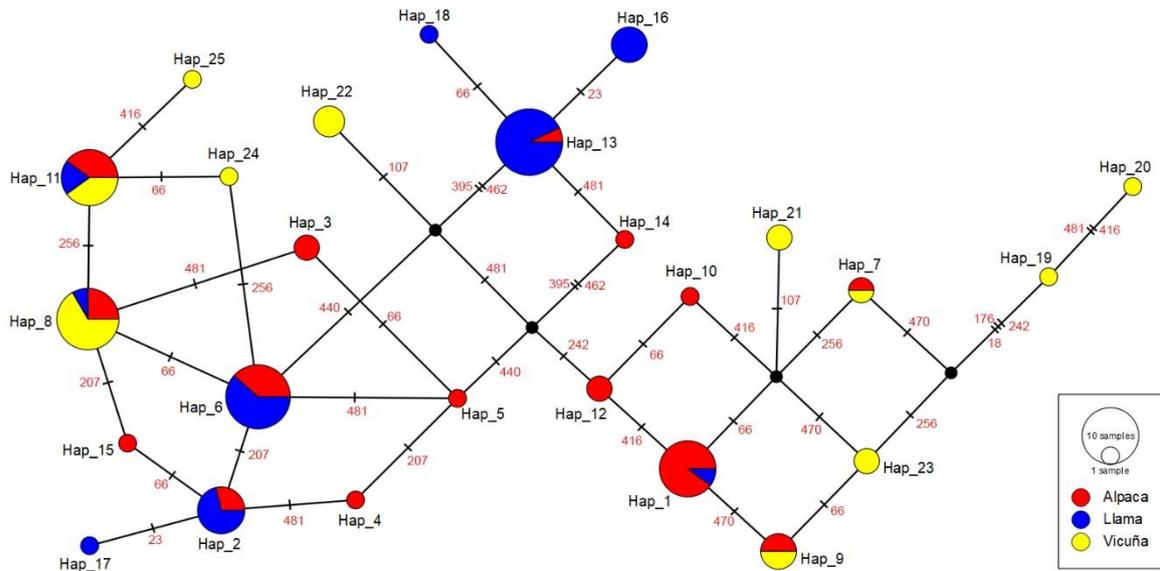
**Tabla 14: Valores de los índices de diversidad genética en las repeticiones ricas en leucinas de los genes *TLR2* y *TLR4* y exón 2 del gen *DRB1* para tres especies de camélidos sudamericanos**

Gen	Población	Índices de diversidad genética						
		n	S	h	Hd ± SD	$\pi$ ± SD	$\theta_w$	k
TLR2	Alpaca	36	10	15	0.906 ± 0.030	0.00461 ± 0.002708	0.00346	3.20794
	Llama	36	10	9	0.805 ± 0.043	0.00366 ± 0.002240	0.00346	2.55079
	Vicuña	26	10	11	0.877 ± 0.046	0.00527 ± 0.003069	0.00377	3.66769
	Total	98	14	25	0.923 ± 0.011	0.00525 ± 0.00025	0.00390	3.65580
TLR4	Alpaca	36	2	3	0.398 ± 0.081	0.000831 ± 0.000868	0.00097	0.411111
	Llama	36	2	4	0.697 ± 0.037	0.001789 ± 0.001424	0.00097	0.885714
	Vicuña	36	1	2	0.056 ± 0.052	0.000112 ± 0.000288	0.00049	0.055556
	Total	108	3	5	0.476 ± 0.049	0.00118 ± 0.00014	0.00115	0.58463
DRB1	Alpaca	6	5	4	0.867 ± 0.129	0.00771 ± 0.005766	0.00817	2.06667
	Llama	12	4	5	0.742 ± 0.116	0.00616 ± 0.004384	0.00494	1.65152
	Vicuña	22	7	7	0.831 ± 0.043	0.00943 ± 0.005885	0.00717	2.52814
	Total	40	8	10	0.849 ± 0.034	0.00836 ± 0.00058	0.00702	2.24103

*Nota:* n= número de secuencias; S= número de sitios polimórficos; h= número de haplotipos; Hd= diversidad haplotípica;  $\pi$ = diversidad nucleotídica;  $\theta_w$ = estimador de Watterson (o Theta per site); k= número promedio de diferencias nucleotídicas; SD= desviación estándar

## 4.7 Red de haplotipos

Las redes de haplotipos representan las relaciones entre los diferentes genotipos haploides observados en el conjunto de datos. Es una herramienta de muchísima utilidad pues resume de manera gráfica las frecuencias de los haplotipos y las relaciones genealógicas entre ellos (Barahona Padilla, 2014)



**Figura 49.** Red de haplotipos para la región LRR del gen *TLR2* mediante el método Median-Joining. El tamaño de los nodos es proporcional a la frecuencia del haplotipo presente en las poblaciones muestreadas. Los colores representan a cada una de las poblaciones mencionadas en la leyenda. Los nodos negros (“median vector”) son haplotipos hipotéticos no muestreados. Los números rojos en las líneas de conexión indican la mutación que distancia a cada haplotipo. Hap= Haplotipo

La red haplotípica obtenida para la región LRR del gen *TLR2* se observa la gran mayoría de haplotipos vinculados entre sí. Lo que apoya a los resultados de la diversidad genética donde se estimaba una baja diversidad entre las especies de camélidos. La distancia máxima entre haplotipos es de tres mutaciones como máximo. Los haplotipos más lejanos (es decir aquellos derivados raros por mutación) que no se vinculan con la red principal son: el Hap\_16, Hap\_17, Hap\_18, Hap\_19, Hap\_20, Hap\_21, Hap\_22 y Hap\_25. De los cuales 5 resultaron en haplotipos privados para vicuñas (Hap\_19, Hap\_20, Hap\_21, Hap\_22 y Hap\_25) y 3 haplotipos privados para llamas (Hap\_16, Hap\_17 y Hap\_18). Se obtuvieron 7 haplotipos propios para las alpacas (Hap\_3, Hap\_4, Hap\_5, Hap\_10, Hap\_12, Hap\_14 y Hap\_15) Los haplotipos número 6 y 13 fueron los más frecuentes (Tabla 15). Los haplotipos

número 8 y 11, son compartidos por las 3 especies de camélidos sudamericanos. Los haplotipos número 1, 2, 6 y 13 fueron identificados tanto en alpacas como en llamas. Los haplotipos 7 y 9 fueron comunes tanto para alpacas como para vicuñas (Figura 49).

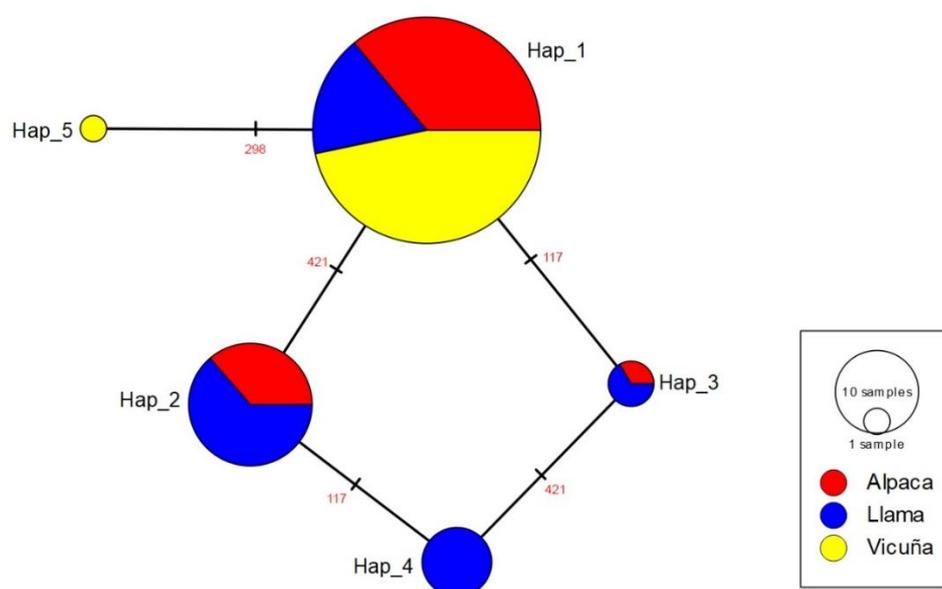
**Tabla 15: Lista de haplotipos y su frecuencia dentro de la población de camélidos sudamericanos para la región LRR del gen *TLR2***

Haplotipo	Cantidad	Descripción	Frecuencia (%) <sup>a</sup>			
			Alpaca (n=6)	Llama (n=12)	Vicuña (n=22)	Total (n=40) <sup>b</sup>
Hap_1	10	Alpaca (9) Llama (1)	25.00	2.78	0.00	10.20
Hap_2	7	Alpaca (2) Llama (5)	5.56	13.89	0.00	7.14
Hap_3	2	Alpaca (2)	5.56	0.00	0.00	2.04
Hap_4	1	Alpaca (1)	2.78	0.00	0.00	1.02
Hap_5	1	Alpaca (1)	2.78	0.00	0.00	1.02
Hap_6	13	Alpaca (5) Llama (8)	13.89	22.22	0.00	13.27
Hap_7	2	Alpaca (1) Vicuña (1)	2.78	0.00	3.85	2.04
Hap_8	12	Alpaca (3) Llama (1) Vicuña (8)	8.33	2.78	30.77	12.24
Hap_9	4	Alpaca (2) Vicuña (2)	5.56	0.00	7.69	4.08
Hap_10	1	Alpaca (1)	2.78	0.00	0.00	1.02
Hap_11	10	Alpaca (4) Llama (2) Vicuña (4)	11.11	5.56	15.38	10.20
Hap_12	2	Alpaca (2)	5.56	0.00	0.00	2.04
Hap_13	14	Alpaca (1) Llama (13)	2.78	36.11	0.00	14.29
Hap_14	1	Alpaca (1)	2.78	0.00	0.00	1.02
Hap_15	1	Alpaca (1)	2.78	0.00	0.00	1.02
Hap_16	4	Llama (4)	0.00	11.11	0.00	4.08
Hap_17	1	Llama (1)	0.00	2.78	0.00	1.02
Hap_18	1	Llama (1)	0.00	2.78	0.00	1.02
Hap_19	1	Vicuña (1)	0.00	0.00	3.85	1.02
Hap_20	1	Vicuña (1)	0.00	0.00	3.85	1.02

Continuación...

Hap_21	2	Vicuña (2)	0.00	0.00	7.69	2.04
Hap_22	3	Vicuña (3)	0.00	0.00	11.54	3.06
Hap_23	2	Vicuña (2)	0.00	0.00	7.69	2.04
Hap_24	1	Vicuña (1)	0.00	0.00	3.85	1.02
Hap_25	1	Vicuña (1)	0.00	0.00	3.85	1.02

*Nota:* La descripción indica la cantidad de individuos por especie que presentan el haplotipo correspondiente. <sup>a</sup>Frecuencia porcentual del haplotipo dentro de los individuos mencionados en la descripción con respecto al total de secuencias para cada individuo(n). <sup>b</sup>Frecuencia porcentual de la cantidad de haplotipos obtenidos con respecto al total de secuencias



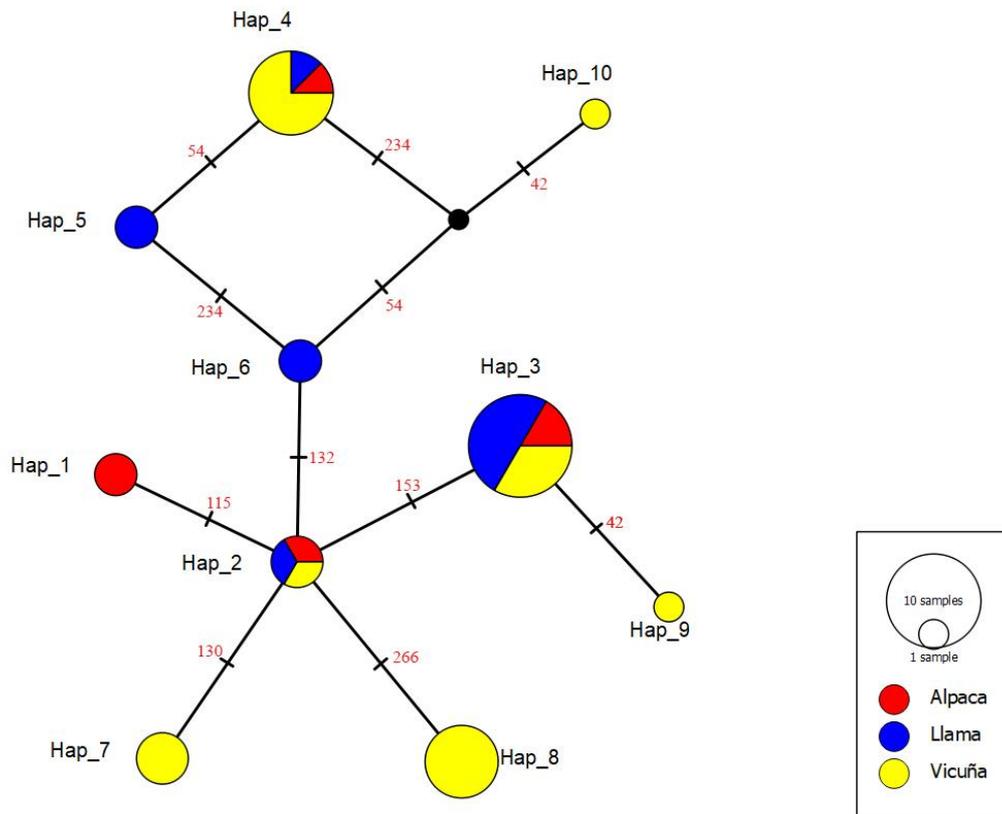
**Figura 50.** Red de haplotipos para la región LRR del gen *TLR4* mediante el método Median-Joining. El tamaño de los nodos es proporcional a la frecuencia del haplotipo presente en las poblaciones muestreadas. Los colores representan a cada una de las poblaciones mencionadas en la leyenda. Los números rojos en las líneas de conexión indican la mutación que distancia a cada haplotipo. Hap= Haplotipo

En la red haplotípica para el caso de la región LRR del gen *TLR4* solo se observa un haplotipo lejano y privado para las vicuñas (Hap\_5). El resto de los haplotipos obtenidos están altamente vinculados, lo que es típico de una diferenciación genética muy baja. La distancia máxima entre haplotipos es de una mutación como máximo. El haplotipo número 1 fue el que se representó con mayor frecuencia dentro de la población de camélidos sudamericanos y la que es compartida por todas las especies (Tabla 16). Los haplotipos número 2 y 3 están presentes en alpacas y llamas. Se obtuvo un haplotipo privado para llamas (Hap\_4). Para las alpacas, no se encontraron haplotipos propios de esta especie (Figura 50).

**Tabla 16:** Lista de haplotipos y su frecuencia dentro de la población de camélidos sudamericanos para la región LRR del gen *TLR4*

Haplotipo	Cantidad	Descripción	Frecuencia (%) <sup>a</sup>			
			Alpaca (n=36)	Llama (n=36)	Vicuña (n=36)	Total (n=108) <sup>b</sup>
Hap_1	75	Alpaca (27) Llama (13) Vicuña (35)	75.00	36.11	97.22	69.44
Hap_2	22	Alpaca (8) Llama (14)	22.22	38.89	0.00	20.37
Hap_3	3	Alpaca (1) Llama (2)	2.78	5.56	0.00	2.78
Hap_4	7	Llama (7)	0.00	19.44	0.00	6.48
Hap_5	1	Vicuña (1)	0.00	0.00	2.78	0.93

*Nota:* La descripción indica la cantidad de individuos por especie que presentan el haplotipo correspondiente. <sup>a</sup>Frecuencia porcentual del haplotipo dentro de los individuos mencionados en la descripción con respecto al total de secuencias para cada individuo(n). <sup>b</sup>Frecuencia porcentual de la cantidad de haplotipos obtenidos con respecto al total de secuencias



**Figura 51.** Red de haplotipos para el exón 2 del gen *DRB1* mediante el método Median-Joining. El tamaño de los nodos es proporcional a la frecuencia del haplotipo presente en las poblaciones muestreadas. Los colores representan a cada una de las poblaciones mencionadas en la leyenda. Los nodos negros (“median vector”) son haplotipos hipotéticos no muestreados. Los números rojos en las líneas de conexión indican la mutación que distancia a cada haplotipo. Hap= Haplotipo

Para el caso del exón 2 del gen DRB, la red haplotípica muestra un grupo muy vinculado (Hap\_4, Hap\_5 y Hap\_6). También existe un grupo separado (haplogrupo) del cual el Hap\_2 es el central y de donde derivan los demás haplotipos (Hap\_1, Hap\_3, Hap\_7 y Hap\_8). Los haplotipos 2, 3 y 4 fueron compartidos por las 3 especies de camélidos sudamericanos y siendo el Hap\_3 el de mayor frecuencia dentro de la población total (Tabla 17). Los haplotipos distantes obtenidos pertenecen a las vicuñas (Hap\_9 y Hap\_10). Se identificaron 4 haplotipos privados para vicuñas (Hap\_7, Hap\_8, Hap\_9 y Hap\_10), 2 para llamas (Hap\_5 y Hap\_6) y uno para alpacas (Hap\_1) (Figura 51).

**Tabla 17: Lista de haplotipos y su frecuencia dentro de la población de camélidos sudamericanos para el exón 2 del gen DRB1**

Haplotipo	Cantidad	Descripción	Frecuencia (%) <sup>a</sup>			
			Alpaca (n=6)	Llama (n=12)	Vicuña (n=22)	Total (n=40) <sup>b</sup>
Hap_1	2	Alpaca (2)	33.33	0.00	0.00	5.00
Hap_2	3	Alpaca (1)	16.67	8.33	4.55	7.50
		Llama (1)				
		Vicuña (1)				
Hap_3	12	Alpaca (2)	33.33	50.00	18.18	30.00
		Llama (6)				
		Vicuña (4)				
Hap_4	8	Alpaca (1)	16.67	8.33	27.27	20.00
		Llama (1)				
		Vicuña (6)				
Hap_5	2	Llama (2)	0.00	16.67	0.00	5.00
Hap_6	2	Llama (2)	0.00	16.67	0.00	5.00
Hap_7	3	Vicuña (3)	0.00	0.00	13.64	7.50
Hap_8	6	Vicuña (6)	0.00	0.00	27.27	15.00
Hap_9	1	Vicuña (1)	0.00	0.00	4.55	2.50
Hap_10	1	Vicuña (1)	0.00	0.00	4.55	2.50

*Nota:* La descripción indica la cantidad de individuos por especie que presentan el haplotipo correspondiente. <sup>a</sup>Frecuencia porcentual del haplotipo dentro de los individuos mencionados en la descripción con respecto al total de secuencias para cada individuo(n). <sup>b</sup>Frecuencia porcentual de la cantidad de haplotipos obtenidos con respecto al total de secuencias

De los datos obtenidos puede inferirse que para el caso el gen *TLR2* no se podría identificar como un haplotipo ancestral cuya definición; y según la teoría de la genética de poblaciones, se basa en su relación con el mayor número de haplotipos que desciende de este (Posada & Crandall, 2001). Se podría indicar como una posibilidad de ancestro al haplotipo 6 (Hap\_6). Sin embargo, no se han identificado individuos de la especie de vicuñas y más solo están presentes alpacas y llamas. Lo que caería en una contradicción con los postulados de Wheeler (1991, 1995) donde indica a la vicuña como ancestro en común.

Para el gen *TLR4* tampoco se pudo identificar un ancestro común al ser un clúster de haplotipos muy vinculados entre sí. Se podría hipotetizar que el haplotipo 1 (Hap\_1) sería el posible ancestro al tener en su grupo a todos los haplotipos presentes de vicuñas para este gen y posteriormente bifurcarse hacia el resto.

Finalmente, para el caso del gen *DRBI* como se evidencian dos haplogrupos definidos, si se podría tomar a dos nodos como los posibles ancestros. Tales nodos pueden ser el haplotipo 2 (Hap\_2) o el haplotipo 4 (Hap\_4). Además, como dentro de este conjunto de haplotipos están presentes las vicuñas, apoya la teoría de la descendencia a partir de la vicuña como ancestro en común.

#### **4.8 Pruebas de neutralidad**

Los resultados obtenidos por las pruebas de neutralidad (Tabla 18) indican si los genes evaluados son los que posiblemente están bajo un proceso de expansión o selección balanceada dentro de cada especie y en la población en general de camélidos. No se evalúa si la población total e independiente de camélidos es la que sufre los procesos de expansión o contracción.

El estadístico D de Tajima para el análisis en el gen *TLR2* dieron resultados positivos y no significativos, lo que indicaría una selección positiva de los haplotipos más frecuentes y una contracción en la población tanto independientemente para cada especie de camélido como para la población total. Sin embargo, los resultados obtenidos por el estadístico  $F_s$  de Fu indican que, para la población de alpacas y la población total, el gen sufre una expansión debido a valores negativos y significativos. Los resultados para el estadístico  $D^*$  de Fu y  $L_i$  mostraron valores negativos y no significativos únicamente en las llamas. No obstante, para

el resto de las especies resultaron en valores positivos y solo significativos para las vicuñas y la población total. Finalmente, se obtuvieron los valores positivos y no significativos para el estadístico  $R_2$ , lo cual no indicaría una expansión.

Los análisis de neutralidad en el gen *TLR4* indican que los valores obtenidos para el D de Tajima denotarían una posible expansión después de un cuello de botella al presentar valores negativos, pero no significativos dentro de las poblaciones de alpacas y vicuñas. Sin embargo, en llamas se presenta un valor positivo y no significativo, lo que indicaría una selección balanceada y contracción. Además, el valor obtenido dentro de la población total es muy cercana a cero, por lo que se podría inferir que estas secuencias estarían evolucionando en equilibrio. Los resultados del estadístico  $F_s$  de Fu y  $D^*$  de Fu y Li presentan valores similares: negativos no significativos (exceptuando el  $F_s$  significativo obtenido en vicuñas) para alpacas, vicuñas y población total y positivo no significativo en llamas. Se obtuvieron valores positivos no significativos en el estadístico  $R_2$  en todas las especies de camélidos sudamericanos evaluados.

Para el caso del exón 2 del gen *DRBI*, se obtuvieron valores positivos no significativos para el estadístico D de Tajima en llamas, vicuñas y población total y un valor negativo no significativo para las alpacas. Para el estadístico  $F_s$  de Fu, todos los valores fueron negativos y no significativos. En cambio, los valores  $D^*$  de Fu y Li fueron positivos no significativos para llamas, vicuñas y población total mientras que para las alpacas resulto en un valor negativo no significativo. Finalmente, y al igual que en la evaluación de los otros genes, el estadístico  $R_2$  resulto en valores positivos no significativos para todas las especies de camélidos.

Los resultados obtenidos por las diferentes pruebas de neutralidad son muy variables en cuanto a su interpretación. Si bien resultados obtenidos usando los datos proporcionados por este estudio con ciertas pruebas estadísticas conllevan a una interpretación específica, estos mismos datos bajo otras pruebas estadísticas diferente dieron como resultado una interpretación que llega a ser contradictoria con las demás. Por tal motivo para la interpretación de datos se seleccionó al estadístico  $F_s$  de Fu. Ya que para tamaños muestrales grandes es el índice más poderoso (Barahona Padilla, 2014).

Por tal motivo, para el caso de la región LRR del gen *TLR2* se acepta la hipótesis donde estos alelos en alpacas y en la población total de camélidos sudamericanos están bajo un proceso

de expansión. Mientras que para los casos de llamas y vicuñas se rechaza dicha hipótesis. Para la región LRR del gen *TLR4* solo en las vicuñas estos alelos están bajo un proceso de expansión, mientras que para la población de alpacas y total esta hipótesis se rechaza y en las llamas se rechaza la hipótesis donde estos alelos han sufrido un proceso de selección o reciente cuello de botella. Finalmente, para el exón 2 del gen *DRB1*, en todas las poblaciones se rechaza la hipótesis donde estos alelos sufren de un proceso de expansión.

**Tabla 18: Pruebas de neutralidad**

Gen	Población	D de Tajima	Fs de Fu	D* Fu y Li	R <sub>2</sub> (Ramos-Onsins y Rozas)
TLR2	Alpaca	1.00607	-5.136**	1.40386	0.1604
	Llama	0.17595	-0.872	-0.29408	0.1290
	Vicuña	1.30764	-1.911	1.40691**	0.1834
	Total	0.95042	-9.002**	1.54919**	0.1306
TLR4	Alpaca	-0.28681	-0.207	-0.79581	0.1210
	Llama	1.62524	0.272	0.78344	0.2214
	Vicuña	-1.13321	-1.362**	-1.74115	0.1643
	Total	0.04252	-0.976	-0.60322	0.0996
DRB1	Alpaca	-0.31466	-0.439	-0.21471	0.2477
	Llama	0.86816	-0.673	0.36794	0.1981
	vicuña	1.01305	-0.300	1.29306	0.1806
	Total	0.54630	-1.933	1.31111	0.1401

Nota: Significancia estadística \*p < 0.1 y \*\*p < 0.05

#### 4.9 Diferenciación genética

La comparación a pares de  $F_{ST}$  para evaluar la diferenciación entre las poblaciones de camélidos mostraron valores de una moderada diferenciación, gran diferenciación o diferenciación muy grande para los genes *TLR2* y *TLR4* entre las poblaciones. Mientras que los valores  $F_{ST}$  para el gen *DRB1* indican una muy poca o nula diferenciación entre las poblaciones.

Dentro del análisis para la región LRR del gen *TLR2* se evidencia una gran diferenciación genética entre alpacas y llamas ( $F_{ST}=0.24276$ ), una diferenciación moderada entre alpacas y vicuñas ( $F_{ST}=0.08155$ ) y una diferenciación muy grande ( $F_{ST}=0.30268$ ) entre las llamas y vicuñas (Tabla 19).

**Tabla 19: Comparaciones genéticas  $F_{ST}$  para la región LRR del gen *TLR2* por pares entre las tres especies de camélidos sudamericanos**

	Alpaca	Llama	Vicuña
Alpaca		$0.00000 \pm 0.0000^*$	$0.01178 \pm 0.0010^*$
Llama	0.24276		$0.00000 \pm 0.0000^*$
Vicuña	0.08155	0.30268	

*Nota:* Debajo de la diagonal los valores  $F_{ST}$ , por encima de la diagonal los valores p-value

\* $p < 0.05$

El análisis  $F_{ST}$  para la región LRR del gen *TLR4* mostraron una gran diferenciación de las alpacas con respecto a las llamas ( $F_{ST}=0.19967$ ) y vicuñas ( $F_{ST}=0.16000$ ). Mientras que la diferenciación entre las llamas y vicuñas resulto ser muy elevada ( $F_{ST}=0.45346$ ) (Tabla 20).

**Tabla 20: Comparaciones genéticas  $F_{ST}$  para la región LRR del gen *TLR4* por pares entre las tres especies de camélidos sudamericanos**

	Alpaca	Llama	Vicuña
Alpaca		$0.00030 \pm 0.0000^*$	$0.00594 \pm 0.0010^*$
Llama	0.19967		$0.00000 \pm 0.0000^*$
Vicuña	0.16000	0.45346	

*Nota:* Debajo de la diagonal los valores  $F_{ST}$ , por encima de la diagonal los valores p-value

\* $p < 0.05$

Finalmente, los valores  $F_{ST}$  para el análisis del exón 2 del gen *DRBI* muestran un valor negativo ( $F_{ST}=-0.00416$ ) dentro de la comparación entre alpacas y llamas. Valores negativos para  $F_{ST}$  son considerados como cero ( $F_{ST}=0$ ) (Sánchez Márquez, 2017), por lo que se inferiría que existe una nula diferenciación entre alpacas y llamas. Mientras que la diferenciación entre alpacas y vicuñas resulto ser poca ( $F_{ST}=0.04199$ ) al igual que la comparación entre llamas y vicuñas ( $F_{ST}=0.00895$ ) (Tabla 21).

**Tabla 21: Comparaciones genéticas  $F_{ST}$  para el exón 2 del gen *DRB1* por pares entre las tres especies de camélidos sudamericanos**

	Alpaca	Llama	Vicuña
Alpaca		$0.41867 \pm 0.0054$	$0.15484 \pm 0.0037$
Llama	-0.00416		$0.35868 \pm 0.0049$
Vicuña	0.04199	0.00895	

Nota: Debajo de la diagonal los valores  $F_{ST}$ , por encima de la diagonal los valores p-value

\* $p < 0.05$

#### 4.10 Identificación de cambios aminoacídicos

Se identificaron los codones de inicio para la región LRR del gen *TLR2* y *TLR4* resultando ser +1 en ambos casos. Mientras que para el exón 2 del gen *DRB1* resultó en +3.

Se identificaron en la región LRR del gen *TLR2* 4 sitios sinónimos (V6V, A22A, L69L y G154G) y 10 sitios representativos. Para la región LRR del gen *TLR4* todos los cambios de aminoácidos fueron representativos (D39E, I100V y E141K). Finalmente, para el exón 2 del gen *DRB1* se identificaron 5 cambios sinónimos y 3 cambios representativos (V39M, A44S y R89Q) (Anexos 7-9). Cabe mencionar que para este último gen el aminoácido 44 puede presentar 2 cambios nucleotídicos en su triplete, por lo que la combinación en algunos casos podría dar cambios sinónimos tales como A44A o S44S.

En ninguno de los cambios producidos hubo una variación de leucinas por otro aminoácido distinto. Sin embargo, en el aminoácido 132 de la región LRR del gen *TLR2* se produce en algunos individuos un cambio de prolina por una leucina. Por lo que dicho cambio aumentaría ligeramente la proporción de leucinas dentro de la secuencia (Tabla 22)

**Tabla 22: Cambios de aminoácidos dentro de las repeticiones ricas en leucinas de los genes TLR2 y TLR4 y el exón 2 del gen DRB1 debido a los sitios polimórficos encontrados**

Gen	Nucleótido		Aminoácido		
	Sitio	Alelo <sup>a</sup>	Sitio	Alelo <sup>a</sup>	Característica <sup>b</sup>
TLR2	18	C/T	6	V/V	NP/NP
	23	C/T	8	A/V	NP/NP
	66	C/T	22	A/A	NP/NP
	107	G/A	36	R/H	+/+
	175	A/C	59	N/H	P/+
	207	G/A	69	L/L	NP/NP
	242	G/C	81	G/A	P/NP
	256	C/G	86	H/D	+/-
	395	C/T	132	P/L	NP/NP
	416	C/T	139	T/M	P/NP
	440	G/A	147	S/N	P/P
	462	G/A	154	G/G	P/P
	470	A/G	157	N/S	P/P
	481	G/A	161	E/K	-/+
TLR4	117	T/G	39	D/E	-/-
	298	A/G	100	I/V	NP/NP
	421	G/A	141	E/K	-/+
DRB1	44	C/T	14	N/N	P/P
	56	G/A	18	R/R	+/+
	117	G/A	39	V/M	NP/NP
	132	G/T	44	A/S	NP/P
	134	A/G	44	A/S	NP/P
	155	G/A	51	P/P	NP/NP
	236	T/C	78	Y/Y	P/P
268	G/A	89	R/Q	+/P	

*Nota:* <sup>a</sup>Alelo de referencia del GeneBank (izquierda)/alelo distinto identificado en las secuencias (derecha).

<sup>b</sup>P= polar, NP= no polar, += positivo, -= negativo

## V. CONCLUSIONES

- Los cebadores elaborados fueron óptimos para la amplificación de la región LRR de los genes *TLR2* y *TLR4* y para el exón 2 de los genes *DPB1*, *DQB1* y *DRB1*.
- Se evidencio por primera vez la presencia de sitios polimórficos en las repeticiones LRR de los genes *TLR2*, *TLR4* y para el exón 2 del gen *DRB1* en alpacas, llamas y vicuñas.
- Existe una mayor variabilidad en la región LRR del gen *TLR2* en la población de vicuñas y en las llamas para la región LRR del gen *TLR4* sin embargo no es significativa. Mientras que la variabilidad para el exón 2 del gen *DRB1* fue casi homogénea para las tres especies de camélidos sudamericanos. Por tal motivo, las alpacas, llamas y vicuña presentan una similar variabilidad genética para las regiones LRR en los genes *TLR2* y *TLR4* y para el exón 2 del gen *DRB*.
- El grado de diferenciación genética para los genes *TLR2* y *TLR4* es mayor entre llamas/alpacas y llamas/vicuñas y moderado entre alpacas/vicuñas. Esto sostiene el hecho de que las alpacas y vicuñas están más emparentadas al ser las primeras la forma domesticada de la segunda.
- No se evidencio diferenciación genética para el exón 2 del gen *DRB1* entre las tres especies de camélidos sudamericanos evaluados a pesar de que dicho gen es uno de los que presenta mayor cantidad de polimorfismos dentro de cualquier especie.

## VI. RECOMENDACIONES

- Se debe cuidar la correcta estimación de la concentración del ADN para procesos de secuenciamiento, así como también evitar el uso de cebadores degenerados.
- Se sugiere que estudios futuros puedan evaluar la variabilidad de los genes de inmunidad evaluados en este estudio en la población de guanacos (*Lama guanicoe*).
- Se recomienda evaluar la diversidad de los genes de inmunidad en distintas poblaciones de vicuñas, así como en poblaciones de alpacas y llamas que estén regidas o no bajo selección artificial. Esto con el fin de poder identificar la posible existencia de una mayor cantidad de haplotipos, así como también la ampliación en la identificación de sitios polimórficos que sean podrían ser relevantes al tener una posible vinculación con enfermedades.
- Evaluar la presencia de sitios polimórficos en regiones distintas al LRR dentro de los genes *TLR2* y *TLR4* que también presentan repeticiones de leucinas. Al igual que en los LRR presentes en los diferentes tipos de genes *Toll Like Receptor*.

## VII. BIBLIOGRAFÍA

- Abbas, A., Lichtman, A.; & Pillai, S. (2012). *Inmunología Celular y Molecular* (7° ed.). Barcelona, España: Elsevier.
- Abrantes, J.; Areal, H.; & Esteves, P. (2013). Insights into the European rabbit (*Oryctolagus cuniculus*) innate immune system: genetic diversity of the toll-like receptor 3 (TLR3) in wild populations and domestic breeds. *BMC Genetics*, 14(73): 1–7. Doi: 10.1186/1471-2156-14-73
- Aguilar, J. (2011). Determinación de la variabilidad genética en tres poblaciones de vicuñas (*Vicugna vicugna mensalis*) en cautiverio a partir de muestras de heces (Tesis para optar por el título profesional, Universidad Nacional Mayor de San Marcos). Recuperada de [https://cybertesis.unmsm.edu.pe/bitstream/handle/20.500.12672/1218/Aguilar\\_lj.pdf](https://cybertesis.unmsm.edu.pe/bitstream/handle/20.500.12672/1218/Aguilar_lj.pdf)
- Aljanabi, S. M.; & Martinez, I. (1997). Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR-based techniques. *Nucleic Acids Research*, 25(22): 4692–4693. Doi: 10.1093/nar/25.22.4692
- Altschul, S.; Madden, T.; Schäffer, A.; Zhang, J.; Zhang, Z.; Miller, W.; & Lipman, D. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research*, 25(17): 3389-402. Doi: 10.1093/nar/25.17.3389
- Alves, J. M.; Carneiro, M.; Afonso, S.; Lopes, S.; Garreau, H.; Boucher, S.; Allain, D.; Queney, G.; Esteves, P. J.; Bolet, G.; & Ferrand, N. (2015). Levels and patterns of genetic diversity and population structure in domestic rabbits. *PLoS ONE*, 10(12): 1–20. Doi: 10.1371/journal.pone.0144687
- Arthur, P.; Makarechian, M.; Berg, R.; & Weingardt, R. (1993). Longevity and lifetime productivity of cows in a purebred Hereford and two multibreed synthetic groups under range conditions. *Journal of Animal Science*, 71(5): 1142–1147. Doi: 10.2527/1993.7151142x
- Avery, C. L.; Martin, L. J.; Williams, J. T.; & North, K. E. (2005). Accuracy of haplotype

- estimation in a region of low linkage disequilibrium. *BMC Genetics*, 6: 1–5. Doi: 10.1186/1471-2156-6-S1-S80
- Avilés, D. (2016). Caracterización genética del cuy doméstico en américa del sur mediante marcadores moleculares (Tesis doctoral, Universidad de Córdoba). Recuperada de <https://helvia.uco.es/bitstream/handle/10396/13382/2016000001399.pdf>
- Bandelt, H J.; Forster, P.; & Rohl, A. (1999). Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Molecular Biology and Evolution*, 16(1): 37–48. Doi: Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies
- Barahona, S. (2014). Utilización de loci microsatélites y adn mitocondrial para evaluar la estructuración genético-poblacional de la caballa (*Scomber japonicus* Houttuyn, 1782) en el mar peruano (Tesis para optar por el título profesional, Universidad Nacional Mayor de San Marcos). Recuperada de [https://cybertesis.unmsm.edu.pe/bitstream/handle/20.500.12672/3767/Barahona\\_ps.pdf](https://cybertesis.unmsm.edu.pe/bitstream/handle/20.500.12672/3767/Barahona_ps.pdf)
- Behl, J.; Sharma, A.; Kataria, R.; Kimothi, S.; Bhatia, A.; Behl, R.; & Joshi, B. (2014). Genetic Polymorphisms in the Bovine Toll-Like Receptor 4 (TLR4) and Monocyte Chemo Attractant Protein-1 (CCL2) Genes : SNPs Distribution Analysis in Bos indicus Sahiwal Cattle Breed. *Animal Biotechnology*, 25: 250–265. Doi: 10.1080/10495398.2013.868354
- Bettencourt, B. F.; Santos, M. R.; Fialho, R. N.; Couto, A. R.; Peixoto, M. J.; Pinheiro, J. P.; Spínola, H.; Mora, M. G.; Santos, C.; Brehm, A.; & Bruges-Armas, J. (2008). Evaluation of two methods for computational HLA haplotypes inference using a real dataset. *BMC Bioinformatics*, 9(68): 1–11. Doi: 10.1186/1471-2105-9-68
- Beyene, D. (2014). The State of Knowledge in Designing Primer of interest for successful Polymerase Chain Reaction : A review. *Advanced Journal of Biological Sciences Research*, 2(001): 1–12. Recuperado de <https://www.researchgate.net/publication/269397458>
- Bilton, D. T.; Freeland, J. R.; & Okamura, B. (2001). Dispersal in Freshwater Invertebrates. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 32(1): 159–181. Doi: 10.1146/annurev.ecolsys.32.081501.114016
- Bishop, S. C.; Axford, R. F. E.; Nicholas, F. W.; & Owen, J. B. (2010). Breeding for Disease

- Resistance in Farm Animals (3° ed.). Londres, Reino Unido: CAB International.
- Brenes, E.; Madrigal, K.; & Pérez, F. (septiembre, 2001). El Cluster De Los Camélidos en Perú: Diagnóstico Competitivo y Recomendaciones Estratégicas. Trabajo presentado por el Proyecto andino de competitividad en el Instituto Centroamericano de Administración de Empresas, Costa Rica.
- Brown, A. (2008). Indicators of Genetic Diversity, Genetic Erosion and Genetic Vulnerability for Plant Genetic Resources for Food and Agriculture. Recuperado de <https://www.fao.org/3/i1500e/i1500e20.pdf>
- Browning, S. R.; & Browning, B. L. 2011. Haplotype phasing: Existing methods and new developments. *Nature Reviews Genetics*, 12: 703–714. Doi: 10.1038/nrg3054
- Buck, G. A.; Fox, J. W.; Gunthorpe, M.; Hager, K. M.; Naeve, C. W.; Pon, R. T.; Adams, P. S.; & Rush, J. (1999). Design strategies and performance of custom DNA sequencing primers. *BioTechniques*, 27(3): 528–536. Doi: 10.2144/99273rr01
- Burger, P. (2016). The history of Old World camelids in the light of molecular genetics. *Tropical Animal Health and Production*, 48(5): 905–913. Doi: 10.1007/s11250-016-1032-7
- Calle, R. (1984). Animal Breeding and Production of American Camelids. Lima, Perú: Talleres Graficos de Abril.
- Chen, S. H.; Lin, C. Y.; Cho, C. S.; Lo, C. Z.; & Hsiung, C. A. (2003). Primer Design Assistant (PDA): A web-based primer design tool. *Nucleic Acids Research*, 31(13): 3751–3754. Doi: 10.1093/nar/gkg560
- Ciccarese, S.; Burger, P. A.; Ciani, E.; Castelli, V.; Linguiti, G.; Plasil, M.; Massari, S.; Horin, P.; & Antonacci, R. (2019). The camel adaptive immune receptors repertoire as a singular example of structural and functional genomics. *Frontiers in Genetics*, 10: 1–14. Doi: 10.3389/fgene.2019.00997
- Dahiya, S. S.; Nagarajan, G.; Bharti, V. K.; Swami, S. K.; Mehta, S. C.; Tuteja, F. C.; Narnaware, S. D.; & Patil, N. V. (2014). Sequence analysis of the Toll-like receptor 2 gene of old world camels. *Journal of Advanced Research*, 5(6): 695–704. Doi: 10.1016/j.jare.2013.09.001
- De Lamo, D. (enero, 2011). Camélidos sudamericanos: Historia, usos y sanidad animal.

- Presentado por el Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria en el Ministerio de agricultura, ganadería y pesca, Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina. Recuperado de [https://www.vetcomunicaciones.com.ar/uploadsarchivos/cam\\_\\_lidos\\_sudamericanos.pdf](https://www.vetcomunicaciones.com.ar/uploadsarchivos/cam__lidos_sudamericanos.pdf)
- Delves, P. J.; Martin, S. J.; Burton, D. R.; & Roitt, I. M. (2017). *Roitt's Essential Immunology* (13° ed.). West Sussex, Reino Unido: Wiley.
- Driscoll, C.; Macdonald, D.; & O'Brien, S. (2009). From wild animals to domestic pets, an evolutionary view of domestication. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106: 9971–9978. Doi: 10.1073/pnas.0901586106
- Enkhbayar, P.; Kamiya, M.; Osaki, M.; Matsumoto, T.; & Matsushima, N. (2003). Structural Principles of Leucine-Rich Repeat (LRR) Proteins. *Proteins: Structure, Function and Genetics*, 54(3): 394–403. Doi: 10.1002/prot.10605
- Eurofins Scientific. (marzo, 2019). DNA Sequencing Results Guide. Presentado por Eurofins Genomics, Ebersberg, Alemania. Recuperado de [https://eurofinsgenomics.eu/media/962732/20190315\\_sequencing-result-guide\\_update.pdf](https://eurofinsgenomics.eu/media/962732/20190315_sequencing-result-guide_update.pdf)
- Excoffier, L.; & Lischer, H. E. L. (2010). Arlequin suite ver 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular Ecology Resources*, 3: 564–567. Doi: 10.1111/j.1755-0998.2010.02847.x
- Fallin, D.; & Schork, N. J. (2000). Accuracy of haplotype frequency estimation for biallelic loci, via the expectation-maximization algorithm for unphased diploid genotype data. *American Journal of Human Genetics*, 67(4): 947–959. Doi: 10.1086/303069
- FAO. (junio, 2005). Situación actual de los camélidos sudamericanos en Perú. Trabajo presentado por la Organización de la Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación en el Proyecto de Cooperación Técnica en apoyo a la crianza y aprovechamiento de los Camélidos Sudamericanos en la Región Andina, Perú. Recuperado de [http://tarwi.lamolina.edu.pe/~emellisho/zootecnia\\_archivos/situacion%20alpcas%20peru.pdf](http://tarwi.lamolina.edu.pe/~emellisho/zootecnia_archivos/situacion%20alpcas%20peru.pdf)
- Farrell, L. L.; Schoenebeck, J. J.; Wiener, P.; Clements, D. N.; & Summers, K. M. (2015).

- The challenges of pedigree dog health: approaches to combating inherited disease. *Canine Genetics and Epidemiology*, 2(3): 1–14. Doi: 10.1186/s40575-015-0014-9
- Fitak, R. R.; Mohandesan, E.; Corander, J.; & Burger, P. A. (2016). The de novo genome assembly and annotation of a female domestic dromedary of North African origin. *Molecular Ecology Resources*, 16(1): 314–324. Doi: 10.1111/1755-0998.12443
- Flores, A. (2008). Genética de los camélidos Sudamericanos. Conferencia llevada a cabo en el 13° Congreso Latinoamericano de Genética, Lima, Perú.
- Franklin, W. L. (1982). Biology, ecology and relationship to man of the South American Camelids. En M. A. Mares & H. Genoways (Eds.), *Mammalian Biology in South America*. (pp. 457–489). Pensilvania, USA: Pymatuning Laboratory of Ecology, University of Pittsburgh.
- Freeman, S.; & Herron, J. C. (2014). *Evolutionary Analysis* (5° ed.). Illinois, USA: Pearson.
- Fu, Y.X. (1997). Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection. *Genetics*, 147(2): 915–925. Doi: 10.1093/genetics/147.2.915
- Fu, Y.X.; & Li, W.H. (1993). Statistical tests of neutrality of mutations. *Genetics*, 133(3): 693–709. Doi: 10.1093/genetics/133.3.693
- Garrick, R. C.; Sunnucks, P.; & Dyer, R. J. (2010). Nuclear gene phylogeography using PHASE: Dealing with unresolved genotypes, lost alleles, and systematic bias in parameter estimation. *BMC Evolutionary Biology*, 10: 1-17. Doi: 10.1186/1471-2148-10-118
- Gauthier-Pilthers, H.; & Dagg, A. (1981). *The Camel: its evolution, ecology, behavior, and relationship to man*. Chicago, USA: University of Chicago Press.
- Genepool. (2009). *Sanger Sequencing Troubleshooting Guide*. Presentado por la Universidad de Edimburgo. Edinburgo, Escocia. Recuperado de [https://www.ucdenver.edu/docs/librariesprovider48/facility-cores/sanger\\_troubleshooting\\_guide\\_v1.pdf](https://www.ucdenver.edu/docs/librariesprovider48/facility-cores/sanger_troubleshooting_guide_v1.pdf)
- Gentry, A.; Clutton-Brock, J.; & Groves, C. P. (2004). The naming of wild animal species and their domestic derivatives. *Journal of Archaeological Science*, 31(5): 645–651. Doi: 10.1016/j.jas.2003.10.006

- Guzmán, K. (2011). Identificación de polimorfismos del gen *tlr4* en crías de alpacas con cuadros de neumonías por *Pasteurella multocida* (Tesis para optar por el título profesional, Universidad Nacional Mayor de San Marcos). Recuperada de [https://cybertesis.unmsm.edu.pe/bitstream/handle/20.500.12672/1529/Guzman\\_mk.pdf](https://cybertesis.unmsm.edu.pe/bitstream/handle/20.500.12672/1529/Guzman_mk.pdf)
- Hall, T. (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*, 41: 95–98.
- Harlt, D. L.; & Clark, A. G. (2007). Principles of population genetics (4° ed.). Massachusetts, USA: Sinauer Associates, Inc.
- Hesse, B. (1982). Archaeological Evidence for Camelid Exploitation in the Chilean Andes. *Säugetierkundliche Mitteilungen*, 30(3): 201–211.
- Iserte, J. A.; Stephan, B. I.; Goñi, S. E.; Borio, C. S.; Ghiringhelli, P. D.; & Lozano, M. E. (2013). Family-Specific Degenerate Primer Design: A Tool to Design Consensus Degenerated Oligonucleotides. *Biotechnology Research International*, 2013: 1–9. Doi: 10.1155/2013/383646
- Kadwell, M.; Fernandez, M.; Stanley, H. F.; Baldi, R.; Wheeler, J. C.; Rosadio, R.; & Bruford, M. W. (2001). Genetic analysis reveals the wild ancestors of the llama and the alpaca. *The Royal Society*, 268(1485): 2575–2584. Doi: 10.1098/rspb.2001.1774
- Kemp, B. M.; Winters, M.; Monroe, C.; & Barta, J. L. (2014). How much DNA is lost? Measuring DNA loss of short-tandem-repeat length fragments targeted by the powerplex 16® system using the Qiagen Minelute purification kit. *Human Biology*, 86(4): 313–329. Doi: 10.13110/humanbiology.86.4.0313
- Kim, H.; Kang, N. N.; An, K. H.; Koo, J. H.; & Kim, M. S. (2016). MRPrimerW: a tool for rapid design of valid high-quality primers for multiple target qPCR experiments. *Nucleic Acids Research*, 44(1): 259–266. Doi: 10.1093/nar/gkw380
- Kobe, B.; & Kajava, A. (2001). The leucine-rich repeat as a protein recognition motif. *Current Opinion in Structural Biology*, 11(6): 725–732. Doi: 10.1016/s0959-440x(01)00266-4
- Kong, A.; Masson, G.; Frigge, M. L.; Gylfason, A.; Zusmanovich, P.; Thorleifsson, G.; Olason, P. I.; Ingason, A.; Steinberg, S.; Rafnar, T.; Sulem, P.; Mouy, M.; Jonsson, F.;

- Thorsteinsdottir, U.; Gudbjartsson, D. F.; Stefansson, H.; & Stefansson, K. (2008). Detection of sharing by descent, long-range phasing and haplotype imputation. *Nature Genetics*, 40(9): 1068–1075. Doi: 10.1038/ng.216
- Lazarus, R.; Vercelli, D.; Palmer, L. J.; Klimecki, W. J.; Silverman, E. K.; Richter, B.; Riva, A.; Ramoni, M.; Martinez, F. D.; Weiss, S. T.; & Kwiatkowski, D. J. (2002). Single nucleotide polymorphisms in innate immunity genes: Abundant variation and potential role in complex human disease. *Immunological Reviews*, 190: 9–25. Doi: 10.1034/j.1600-065x.2002.19002.x
- Leigh, J. W.; & Bryant, D. (2015). POPART: full-feature software for haplotype network construction. *Methods in Ecology and Evolution*, 6(9): 1110–1116. Doi: 10.1111/2041-210X.12410
- Li, J.; Yang, H.; Li, J.; Li, H.; Ning, T.; Pan, X. R.; Shi, P.; & Zhang, Y. P. (2010). Artificial selection of the melanocortin receptor 1 gene in Chinese domestic pigs during domestication. *Heredity*, 105: 274–281. Doi: 10.1038/hdy.2009.191
- Linnaeus, C. von. (1758). *Systema naturae, per regna tria naturae :secundum classes, ordines, genera, species cum characteribus, differentiis, synonymis, locis* (10<sup>o</sup> ed.). Viena, Austria: Typis Ioannis Thomae.
- Liu, Z. J.; & Cordes, J. F. (2004). DNA marker technologies and their applications in aquaculture genetics. *Aquaculture*, 238(1–4): 1–37. Doi: 10.1016/j.aquaculture.2004.05.027
- Lumbreras, L.; Aranibar, C.; Burga, M.; Lopez Soria, J.; Flores Galindo, A.; Bonilla, H.; Yepes, E.; Cotler, J.; Espinoza, W.; & Lopez, S. (1978). *Nueva historia general del Perú*. Lima, Perú: Mosca Azul Editores.
- Magalhães, V.; Abrantes, J.; Munõz-Pajares, A. J.; & Esteves, P. J. (2015). Genetic diversity comparison of the DQA gene in European rabbit (*Oryctolagus cuniculus*) populations. *Immunogenetics*, 67(10): 579–590. Doi: 10.1007/s00251-015-0866-x
- Mamani, J., Condemayta, Z.; & Calle, L. (2009). Causas de mortalidad de alpacas en tres principales centros de producción ubicados en puna seca y humeda del departamento de Puno. *Revista Electrónica de Veterinaria*, 10(8): 1–13. Recuperado de <https://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=DJ2012042900>

- Marchini, J.; Cutler, D.; Patterson, N.; Stephens, M.; Eskin, E.; Halperin, E.; Lin, S.; Qin, Z. S.; Munro, H. M.; Abecasis, G. R.; & Donnelly, P. (2006). A comparison of phasing algorithms for trios and unrelated individuals. *American Journal of Human Genetics*, 78(3): 437–450. Doi: 10.1086/500808
- Marin, J. C.; Zapata, B.; Gonzalez, B. A.; Bonacic, C.; Wheeler, J. C.; Casey, C.; Bruford, M. W.; Palma, R. E.; Poulin, E.; Alliende, M. A.; & Spotorno, A. E. (2007). Systematics, taxonomy and domestication of alpaca and llama: new chromosomal and molecular evidence. *Revista Chilena De Historia Natural*, 80: 121–140. Recuperado de [https://repositorio.uchile.cl/bitstream/handle/2250/123837/Domesticacion\\_alpacas\\_llamas.pdf](https://repositorio.uchile.cl/bitstream/handle/2250/123837/Domesticacion_alpacas_llamas.pdf)
- Mariotti, M.; Williams, J. L.; Dunner, S.; Valentini, A.; & Pariset, L. (2009). Polymorphisms within the toll-like receptor (TLR)-2, -4, and -6 genes in cattle. *Diversity*, 1: 7–18. Doi: 10.3390/d1010007
- Marshall, L. G.; Webb, D. S.; Sepkoski, J. J.; & Raup, D. M. (1982). Mammalian Evolution and the Great American Interchange. *Science*, 215(4538): 1351–1357. Recuperado de <https://www.jstor.org/stable/1688046>
- McGrath, K. (octubre, 2014). Sanger Sequencing: Troubleshooting Guide. Presentado por Australian Genome Research Facility, Melbourne, Australia. Recuperado de <https://www.ucdenver.edu/docs/librariesprovider48/facility-cores/sanger-sequencing-troubleshooting-guide-1.pdf>
- Molina, J. (1782). Saggio sulla storia naturale del Chili. Bologna, Italia: Nella Stamperia di S. Tommaso d'Aquino.
- Montes, A.; Quilla, R.; Díaz, M.; Rodríguez, J.; & Agapito, J. (2011). Evaluación del polimorfismo genético mediante PCR-SSCP en dos secuencias del gen TLR2 en alpacas (*Vicugna pacos*) y su relación con enfermedades infecciosas. *Informe Científico Tecnológico-IPEN*, 11(1): 91–96. Recuperado de <https://revistas.ipen.gob.pe/ict/article/view/105>
- Müller, P. (1776). Erste Classe, Säugende Thiere. En Des Ritters Carl von Linné. *Vollständiges Natursystem: nach der zwölften lateinischen Ausgabe, und nach Anleitung des holländischen Houttuynischen Werks, mit einer ausführlichen Erklärung*. Nürnberg, Alemania: Gabriel Nicolaus Raspe.

- Murphy, K.; Weaver, C.; Mowat, A.; Berg, L.; Chaplin, D.; Janeway Jr., C. A.; Travers, P.; & Walport, M. (2017). *Janeway's Immunobiology* (9° ed.). New York, USA: Garland Science.
- Nei, M.; & Li, W. H. (1979). Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 76(10): 5269–5273. Doi: 10.1073/pnas.76.10.5269
- Nei, Masatoshi. (1987). *Molecular Evolutionary Genetics*. New York, USA: Columbia University Press.
- NIH (National Institutes of Health, USA). (25 Febero del 2022). *Primer*. <https://www.genome.gov/genetics-glossary/Primer>
- Ng, A.; & Xavier, R. J. (2011). Leucine-rich repeat (LRR) proteins: Integrators of pattern recognition and signaling in immunity. *Autophagy*, 7(9): 1082–1084. Doi: 10.4161/auto.7.9.16464
- Notter, D. R. (1999). The importance of genetic diversity in livestock populations of the future. *Journal of Animal Science*, 77(1): 61–69. Doi: 10.2527/1999.77161x
- Nucleics. (4 de Noviembre del 2020). *DNA Sequencing Troubleshooting*. [https://www.nucleics.com/DNA\\_sequencing\\_support/DNA-sequencing-troubleshooting.html](https://www.nucleics.com/DNA_sequencing_support/DNA-sequencing-troubleshooting.html)
- Owen, J. A.; Punt, J.; Stranford, S. A.; & Jones, P. P. (2013). *KUBY Immunology* (7° ed.). New York, USA: W. H. Freeman and Company.
- Pajares, W. B. (2018). Análisis de la variabilidad genética de las llamas (*Lama glama*) de la estación experimental agraria santa ana-INIA utilizando la región control del adn mitocondrial (Tesis para optar por el título profesional, Universidad Nacional Agraria de la Molina). Recuperada de <https://repositorio.lamolina.edu.pe/bitstream/handle/20.500.12996/3388/pajares-chirre-wendy-beatriz.pdf>
- Pala, I. T. (2019). A Real-Time PCR Method for the Detection of Greedy Scale (*Hemiberlesia rapax*) (Tesis para optar por el título profesional, Metropolia University of Applied Sciences). Rescatada de [https://www.theseus.fi/bitstream/handle/10024/262219/Irene%20Tukonen%20Pala\\_G](https://www.theseus.fi/bitstream/handle/10024/262219/Irene%20Tukonen%20Pala_G)

reedy%20Scale%20qPCR%20method.pdf

- Paradis, E. (2018). Analysis of haplotype networks: The randomized minimum spanning tree method. *Methods in Ecology and Evolution*, 9(5): 1308–1317. Doi: 10.1111/2041-210X.12969
- Parkin, J.; & Cohen, B. (2001). An overview of the immune system. *The Lancet*, 357(9270): 1777–1789. Doi: 10.1016/S0140-6736(00)04904-7
- Perfectti, F.; Picó, F.; & Gómez, J. (2009). La huella genética de la selección natural. *Ecosistemas*, 18(1): 10–16. Recuperado de <https://www.revistaecosistemas.net/index.php/ecosistemas/article/view/71>
- Plasil, M.; Mohandesan, E.; Fitak, R.; Musilova, P.; Kubickova, S.; Burger, P.; & Horin, P. (2016). The major histocompatibility complex in Old World camelids and low polymorphism of its class II genes. *BMC Genomics*, 17(167): 1–17. Doi: 10.1186/s12864-016-2500-1
- Posada, D., Crandall, K. (2001). Evaluation of methods for detecting recombination from DNA sequences: computer simulations. *Proceeding of the National Academy of Sciences*, 98(24): 13757 – 13762. Doi: 10.1073/pnas.24137069
- Qu, W.; & Chenggang, Z. (2015). PCR Primer Design (2° ed.). New York, USA: Humana Press.
- Ramos-Onsins, S. E.; & Rozas, J. (2002). Statistical Properties of New Neutrality Tests Against Population Growth. *Molecular Biology and Evolution*, 19(12): 2092–2100. Doi: 10.1093/molbev/msl052
- Rhodes, J.; Garland, T.; & Gammie, S. (2003). Patterns of brain activity associated with variation in voluntary wheel-running behavior. *Behavioral Neuroscience*, 117(6): 1243–1256. Doi: 10.1037/0735-7044.117.6.1243
- Richardson, M. F.; Munyard, K.; Croft, L. J.; Allnutt, T. R.; Jackling, F.; Alshanbari, F.; Jevit, M.; Wright, G. A.; Cransberg, R.; Tibary, A.; Perelman, P.; Appleton, B.; & Raudsepp, T. (2019). Chromosome-level alpaca reference genome VicPac3.1 improves genomic insight into the biology of new world camelids. *Frontiers in Genetics*, 10: 1–15. Doi: 10.3389/fgene.2019.00586
- Roos, A. (2020). Origin and current distribution of camelids (Imagen). Museum of Natural

History Stockholm, Sweden. Recuperado de <https://utställning.nrm.se/4.4fd7b99f152b47637006d432.html?id=4.4fd7b99f152b47637006d3aa>

- Rostworowski, M. (1988). *Historia del Tahuantinsuyu*. Lima, Perú: Instituto de Estudios Peruanos.
- Rothberg, J. M., Jacobs, J. R., Goodman, C. S., & Artavanis-Tsakonas, S. (1990). slit: An extracellular protein necessary for development of midline glia and commissural axon pathways contains both EGF and LRR domains. *Genes and Development*, 4(12): 2169–2187. Doi: 10.1101/gad.4.12a.2169
- Rozas, J.; Ferrer-Mata, A.; Sanchez-DelBarrio, J. C.; Guirao-Rico, S.; Librado, P.; Ramos-Onsins, S. E.; & Sanchez-Gracia, A. (2017). DnaSP 6: DNA sequence polymorphism analysis of large data sets. *Molecular Biology and Evolution*, 34(12): 3299–3302. Doi: 10.1093/molbev/msx248
- Sánchez, M. (2017). Variabilidad genética de *Attalea moorei* (glassman) zona “shapaja”, proveniente de cinco poblaciones naturales de la amazonia peruana (Tesis para optar por el título profesional, Universidad Nacional de la Amazonia Peruana). Rescatada de [https://repositorio.unapiquitos.edu.pe/bitstream/handle/20.500.12737/5565/Maria\\_Tesis\\_Titulo\\_2017.pdf](https://repositorio.unapiquitos.edu.pe/bitstream/handle/20.500.12737/5565/Maria_Tesis_Titulo_2017.pdf)
- Sharma, B.; Leyva, I.; Schenkel, F.; & Karrow, N. (2006). Association of toll-like receptor 4 polymorphisms with somatic cell score and lactation persistency in Holstein bulls. *Journal of Dairy Science*, 89(9): 3626–3635. Doi: 10.3168/jds.S0022-0302(06)72402-X
- Sheriff, O.; & Alemayehu, K. (2018). Genetic diversity studies using microsatellite markers and their contribution in supporting sustainable sheep breeding programs: A review. *Cogent Food & Agriculture*, 4(1): 1–9. Doi: 10.1080/23311932.2018.1459062
- Smock, L. A. (2007). Macroinvertebrate Dispersal. En Richard, F. & Lamberti, G., *Methods in Stream Ecology* (pp. 465–487). California, USA: Elsevier.
- Stephens, M.; & Scheet, P. (2005). Accounting for decay of linkage disequilibrium in haplotype inference and missing-data imputation. *American Journal of Human Genetics*, 76(3): 449–462. Doi: 10.1086/428594

- Stephens, M.; Smith, N. J.; & Donnelly, P. (2001). A new statistical method for haplotype reconstruction from population data. *American Journal of Human Genetics*, 68(4): 978–989. Doi: 10.1086/319501
- Tajima, F. (1983). Evolutionary relationship of DNA sequences in finite populations. *Genetics*, 105(2): 437–460. Doi: 10.1093/genetics/105.2.437
- Tajima, F. (1989). Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics*, 123(3): 585–595. Doi: 10.1093/genetics/123.3.585
- Takeda, K.; & Akira, S. (2001). Roles of Toll-like receptors in innate immune responses. *Genes to Cell*, 6(9): 733–742. Doi: 10.1046/j.1365-2443.2001.00458.x
- Takeuchi, O.; Hoshino, K.; Kawai, T.; Sanjo, H.; Ogawa, T.; Takada, H.; Takeda, K.; & Akira, S. (1999). Differential Roles of TLR2 and TLR4 in Recognition of Gram-Negative and Gram-Positive Bacterial Cell Wall Components. *Immunity*, 11(4): 443–451. Doi: 10.1016/s1074-7613(00)80119-3
- Tishkoff, S. A.; Pakstis, A. J.; Ruano, G.; & Kidd, K. K. (2000). The accuracy of statistical methods for estimation of Haplotype frequencies: An example from the CD4 locus. *American Journal of Human Genetics*, 67(2): 518–522. Doi: 10.1086/303000
- Uematsu, S.; & Akira, S. (2006). Toll-like receptors and innate immunity. *Journal of Molecular Medicine*, 84(9): 712–725. Doi: 10.1007/s00109-006-0084-y
- University of Nottingham. (4 de Noviembre del 2020). *Troubleshooting your sequencing results*. <https://www.nottingham.ac.uk/life-sciences/facilities/dna-sequencing/troubleshooting.aspx>
- Valladares, R. (2019). Caracterización molecular de dos poblaciones de cuyes nativos (*Cavia porcellus*) de Cuzco y Puno utilizando marcadores STR (Tesis para optar por el título profesional, Universidad Nacional Agraria de la Molina). Recuperada de <http://repositorio.lamolina.edu.pe/bitstream/handle/20.500.12996/3914/valladares-delgado-rolando-james.pdf>
- Vaure, C.; & Liu, Y. (2014). A comparative review of toll-like receptor 4 expression and functionality in different animal species. *Frontiers in Immunology*, 5: 1–15. Doi: 10.3389/fimmu.2014.00316
- Vilá, B.; & Arzamendia, Y. (2020). South American Camelids: their values and

- contributions to people. *Sustainability Science*, 17: 707-724. Doi: 10.1007/s11625-020-00874-y
- Villanueva, J. (2018). Análisis de la diversidad genética de *Hemileia vastatrix* de Quillabamba mediante secuenciación de las regiones ITS del ADN ribosomal (Tesis para optar por el título profesional, Universidad Nacional Agraria de la Molina). Recuperada de <https://repositorio.lamolina.edu.pe/bitstream/handle/20.500.12996/3621/villanueva-caceda-juan-jose.pdf>
- Watterson, G. A. (1975). On the number of segregating sites in genetical models without recombination. *Theoretical Population Biology*, 7(2): 256–276. Doi: 10.1016/0040-5809(75)90020-9
- Wheeler, J. (1984). La domesticación de la alpaca (*Lama pacos* L.) y la llama (*Lama glama* L.) y el desarrollo temprano de la ganadería autóctona en los andes centrales. *Boletín de Lima*, 6(36), 74–84. Recuperado de <https://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=PE19870000085>
- Wheeler, J. (1991). Los Camélidos Sudamericanos: Origen, Evolución y Status Actual. En S. Fernandez (Ed.), *Avances y perspectivas del conocimiento de los camélidos sudamericanos* (pp. 11–48). Santiago, Chile: FAO.
- Wheeler, J. (1995). Evolution and Present Situation of the South-American Camelidae. *Biological Journal of the Linnean Society*, 54(3): 271–295. Doi: 10.1016/0024-4066(95)90021-7
- Wheeler, J. (2005). The Question of Alpaca Origins. *The Camelid Quarterly*. Recuperado de [http://www.conopa.org/publicaciones/the\\_questions\\_alpaca\\_origins.php](http://www.conopa.org/publicaciones/the_questions_alpaca_origins.php)
- Wheeler, J. C. (2012). South American camelids - past, present and future. *Journal of Camelid Science*, 5: 1–24. Recuperado de <http://www.isocard.net/images/journal/FILE486198178b052d8.pdf>
- Xu, C. F.; Lewis, K.; Cantone, K. L.; Khan, P.; Donnelly, C.; White, N.; Crocker, N.; Boyd, P. R.; Zaykin, D. V.; & Purvis, I. J. (2002). Effectiveness of computational methods in haplotype prediction. *Human Genetics*, 110(2): 148–156. Doi: 10.1007/s00439-001-0656-4

- Xu, T. j.; Chen, S. l.; Ji, X. shan; & Tian, Y. sheng. (2008). MHC polymorphism and disease resistance to *Vibrio anguillarum* in 12 selective Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) families. *Fish and Shellfish Immunology*, 25(3): 213–221. Doi: 10.1016/j.fsi.2008.05.007
- Yang, X.; Li, H.; Guan, Q.; & Liu, D. (2013). Genetic diversity of Toll-like receptor 5 among pig populations. *Genetics and Molecular Biology*, 36(1): 37–42. Doi: 10.1590/S1415-47572013005000004
- Zhang, L.; Gan, Q.; Ma, T.; Li, H.; Wang, X.; Li, J.; Gao, X.; Chen, J.; Ren, H.; & Xu, S. (2009). Toll-Like Receptor 2 Gene Polymorphism and its Relationship with SCS in Dairy Cattle. *Animal Biotechnology*, 20(3): 87–95. Doi: 10.1080/10495390902873096
- Zhang, S.; Pakstis, A. J.; Kidd, K. K.; & Zhao, H. (2001). Comparisons of two methods for haplotype reconstruction and haplotype frequency estimation from population data. *American Journal of Human Genetics*, 69(4): 906–912. Doi: 10.1086/323622
- Zhang, Z.; Schwartz, S.; Wagner, L.; & Miller, W. (2000). A greedy algorithm for aligning DNA sequences. *Journal of Computational Biology*, 7(1–2): 203–214. Doi: 10.1089/10665270050081478

## **VIII. ANEXOS**

**Anexo 1:** Registro de camélidos domésticos

Código de trabajo	Código INIA	Especie	Sexo	Raza	Color de vellón
LG01	147215	<i>Lama glama</i>	Hembra	Q'ara	GRIS/PIVOL
LG02	271314	<i>Lama glama</i>	Hembra	Q'ara	NEGRO/GRIS/CAFÉ
LG03	236214	<i>Lama glama</i>	Hembra	Q'ara	CAFÉ
LG04	246214	<i>Lama glama</i>	Hembra	Q'ara	PIVOL
LG05	89113	<i>Lama glama</i>	Hembra	Q'ara	CAFÉ
LG06	50212	<i>Lama glama</i>	Hembra	Q'ara	BLANCO
LG07	167214	<i>Lama glama</i>	Hembra	Q'ara	CAFÉ
LG08	190410	<i>Lama glama</i>	Hembra	Q'ara	CAFÉ CLARO
LG09	235213	<i>Lama glama</i>	Hembra	Chaku	API
LG10	22114	<i>Lama glama</i>	Hembra	Chaku	CAFÉ
LG11	261314	<i>Lama glama</i>	Hembra	Chaku	API
LG12	101113	<i>Lama glama</i>	Hembra	Chaku	CAFÉ
LG13	259313	<i>Lama glama</i>	Hembra	Chaku	NEGRO
LG14	242214	<i>Lama glama</i>	Hembra	Chaku	GRIS/BLANCO
LG15	80215	<i>Lama glama</i>	Hembra	Chaku	GRIS
LG16	171311	<i>Lama glama</i>	Macho	Q'ara	NEGRO/BLANCO
LG17	47111	<i>Lama glama</i>	Macho	Q'ara	GRIS
LG18	258206	<i>Lama glama</i>	Macho	Q'ara	BLANCO
LG19	20114	<i>Lama glama</i>	Macho	Q'ara	CAFÉ ROJO

Continuación...

LG20	PNIA1 RAK'U	<i>Lama glama</i>	Macho	Q'ara	CAFÉ CLARO
LG21	249312	<i>Lama glama</i>	Macho	Q'ara	PIVOL
LG22	20110	<i>Lama glama</i>	Macho	Q'ara	BLANCO/NEGRO
LG23	181205	<i>Lama glama</i>	Macho	Q'ara	PIVOL
LG24	107113	<i>Lama glama</i>	Macho	Chaku	GRIS
LG25	7113	<i>Lama glama</i>	Macho	Chaku	CAFÉ/BLANCO
LG26	191213	<i>Lama glama</i>	Macho	Chaku	NEGRO
LG27	68106	<i>Lama glama</i>	Macho	Chaku	PIVOL/API
LG28	8110	<i>Lama glama</i>	Macho	Chaku	BLANCO
LG29	406	<i>Lama glama</i>	Macho	Chaku	API
LG30	208214	<i>Lama glama</i>	Macho	Chaku	PIVOL
VP01	133211	<i>Vicugna pacos</i>	Macho	Wakaya	NEGRO
VP02	215208	<i>Vicugna pacos</i>	Macho	Wakaya	CAFÉ
VP03	593	<i>Vicugna pacos</i>	Macho	Wakaya	CAFÉ ROJO
VP04	161214	<i>Vicugna pacos</i>	Macho	Wakaya	CAFÉ OSCURO
VP05	284212	<i>Vicugna pacos</i>	Macho	Wakaya	GRIS
VP06	380312	<i>Vicugna pacos</i>	Macho	Wakaya	BLANCO
VP07	306207	<i>Vicugna pacos</i>	Macho	Wakaya	API
VP08	58104	<i>Vicugna pacos</i>	Macho	Wakaya	LF
VP09	357207	<i>Vicugna pacos</i>	Macho	Suri	BLANCO

Continuación...

---

VP10	275310	<i>Vicugna pacos</i>	Macho	Suri	NEGRO
VP11	58112	<i>Vicugna pacos</i>	Macho	Suri	CAFÉ
VP12	60109	<i>Vicugna pacos</i>	Macho	Suri	CAFÉ OSCURO
VP13	630	<i>Vicugna pacos</i>	Macho	Suri	GRIS
VP14	132215	<i>Vicugna pacos</i>	Macho	Suri	CAFÉ ROJO
VP15	339206	<i>Vicugna pacos</i>	Macho	Suri	API
VP16	68216	<i>Vicugna pacos</i>	Hembra	Wakaya	LF
VP17	7116	<i>Vicugna pacos</i>	Hembra	Wakaya	CAFÉ ROJO
VP18	134113	<i>Vicugna pacos</i>	Hembra	Wakaya	GRIS
VP19	38115	<i>Vicugna pacos</i>	Hembra	Wakaya	BLANCO
VP20	181212	<i>Vicugna pacos</i>	Hembra	Wakaya	NEGRO
VP21	62216	<i>Vicugna pacos</i>	Hembra	Wakaya	CAFÉ CLARO
VP22	46115	<i>Vicugna pacos</i>	Hembra	Wakaya	CAFÉ OSCURO
VP23	69106	<i>Vicugna pacos</i>	Hembra	Wakaya	API
VP24	155215	<i>Vicugna pacos</i>	Hembra	Suri	BLANCO
VP25	251204	<i>Vicugna pacos</i>	Hembra	Suri	NEGRO
VP26	45216	<i>Vicugna pacos</i>	Hembra	Suri	CAFÉ
VP27	311315	<i>Vicugna pacos</i>	Hembra	Suri	CAFÉ OSCURO
VP28	161216	<i>Vicugna pacos</i>	Hembra	Suri	LF
VP29	335415	<i>Vicugna pacos</i>	Hembra	Suri	GRIS
VP30	31116	<i>Vicugna pacos</i>	Hembra	Suri	CAFÉ ROJO

---

**Anexo 2:** Registro de camélidos silvestres

Código de trabajo	Especie	Sexo
VV01	<i>Vicugna vicugna</i>	Hembra
VV02	<i>Vicugna vicugna</i>	Hembra
VV03	<i>Vicugna vicugna</i>	Hembra
VV04	<i>Vicugna vicugna</i>	Hembra
VV05	<i>Vicugna vicugna</i>	Macho
VV06	<i>Vicugna vicugna</i>	Macho
VV07	<i>Vicugna vicugna</i>	Hembra
VV08	<i>Vicugna vicugna</i>	Macho
VV09	<i>Vicugna vicugna</i>	Hembra
VV10	<i>Vicugna vicugna</i>	Hembra
VV11	<i>Vicugna vicugna</i>	Hembra
VV12	<i>Vicugna vicugna</i>	Hembra
VV13	<i>Vicugna vicugna</i>	Macho
VV14	<i>Vicugna vicugna</i>	Hembra
VV15	<i>Vicugna vicugna</i>	Hembra
VV16	<i>Vicugna vicugna</i>	Hembra
VV17	<i>Vicugna vicugna</i>	Macho
VV18	<i>Vicugna vicugna</i>	Macho
VV19	<i>Vicugna vicugna</i>	Macho
VV20	<i>Vicugna vicugna</i>	Hembra
VV21	<i>Vicugna vicugna</i>	Hembra
VV22	<i>Vicugna vicugna</i>	Hembra
VV23	<i>Vicugna vicugna</i>	Hembra
VV24	<i>Vicugna vicugna</i>	Macho
VV25	<i>Vicugna vicugna</i>	Macho
VV26	<i>Vicugna vicugna</i>	Hembra
VV27	<i>Vicugna vicugna</i>	Hembra
VV28	<i>Vicugna vicugna</i>	Hembra
VV29	<i>Vicugna vicugna</i>	Macho
VV30	<i>Vicugna vicugna</i>	Hembra

**Anexo 3:** Cuantificación de ADN nuclear en las especies de camélidos

Especie	Código	Concentración (ng/ $\mu$ l)	Pureza (A <sub>260</sub> /A <sub>280</sub> )
Alpaca	VP1	133.4	1.86
	VP2	151.2	1.89
	VP3	110.6	1.88
	VP4	110.4	1.87
	VP5	117.3	1.94
	VP6	148.4	1.87
	VP7	159.4	1.87
	VP8	129.6	1.89
	VP9	134.2	1.89
	VP10	134.7	1.89
	VP11	92.4	1.94
	VP12	111.6	1.92
	VP13	111.0	1.87
	VP14	93.0	1.94
	VP15	110.5	2.02
	VP16	139.6	1.93
	VP17	229.4	1.83
	VP18	194.1	1.88
	VP19	177.2	1.81
	VP20	122.8	1.94
	VP21	117.5	1.98
	VP22	167.0	1.90
	VP23	139.2	1.96
	VP24	68.1	2.05
	VP 25	130.6	1.90
	VP26	103.7	1.91
	VP27	95.4	1.97
	VP28	108.2	1.97
	VP29	199.8	1.89
	VP30	193.4	1.90

Continuación...

---

Llama	LG1	234.8	1.87
	LG2	175.8	1.92
	LG3	182.7	2.05
	LG4	170.4	1.88
	LG5	179.2	2.10
	LG6	190.4	2.18
	LG7	174.4	2.11
	LG8	200.1	2.40
	LG9	153.3	1.93
	LG10	229.1	2.40
	LG11	214.6	2.29
	LG12	163.2	2.18
	LG13	200.9	1.94
	LG14	259.2	2.02
	LG15	205.9	2.20
	LG16	211.7	1.88
	LG17	172.9	1.99
	LG18	187.6	1.92
	LG19	216.0	2.06
	LG20	139.2	2.39
	LG21	219.2	2.04
	LG22	221.9	1.92
	LG23	158.9	1.93
	LG24	179.2	1.99
	LG25	227.2	2.05
	LG26	192.1	1.94
	LG27	255.2	2.06
	LG28	195.3	1.96
	LG29	183.4	1.95
	LG30	190.8	1.93
Vicuña	VV1	59.5	1.81

---

Continuación...

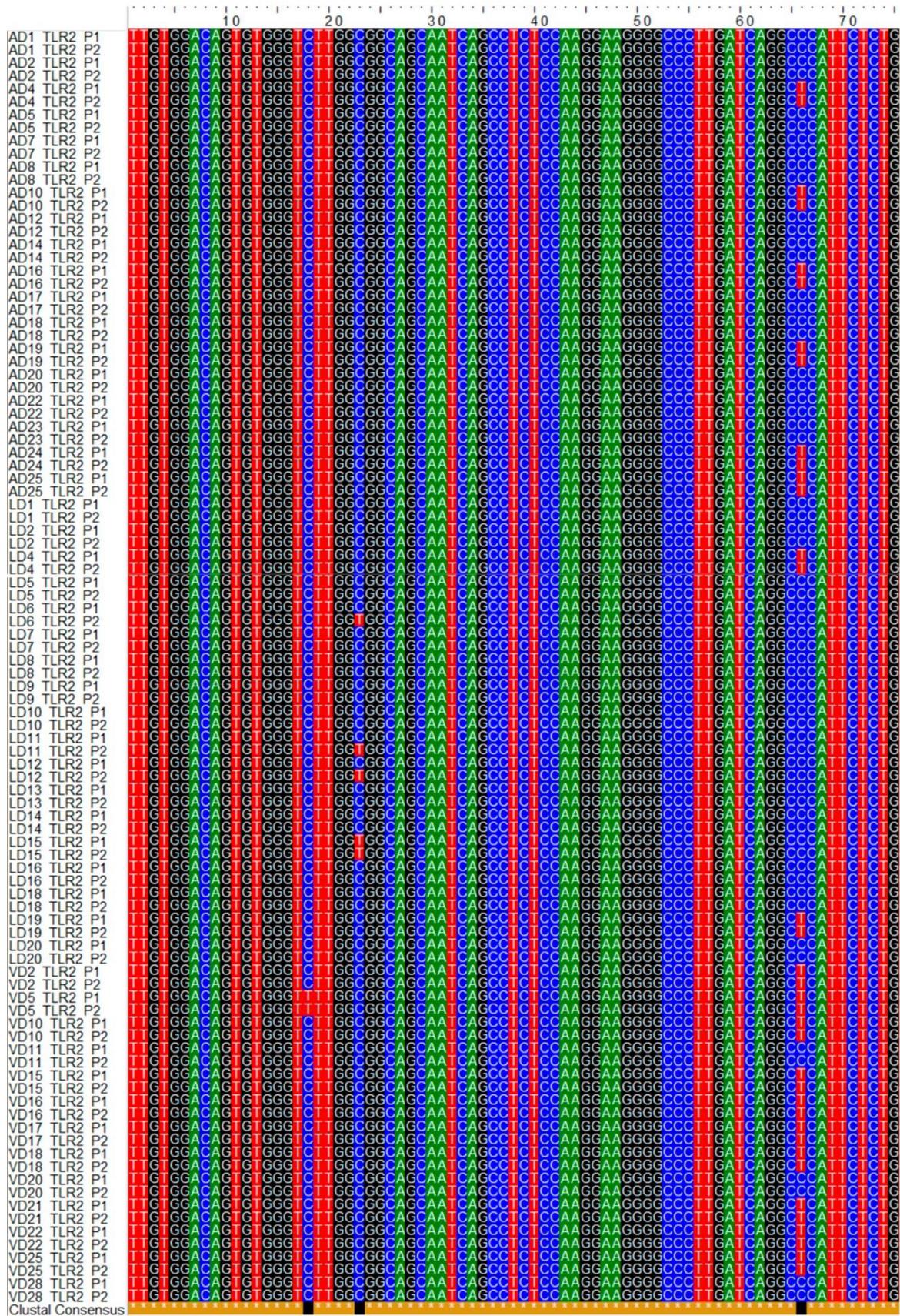
---

VV2	91.5	1.81
VV3	97.5	1.83
VV4	58.7	1.82
VV5	78.6	1.86
VV6	85.4	1.84
VV7	92.3	2.00
VV8	74.1	1.85
VV9	68.5	1.85
VV10	62.3	1.86
VV11	72.8	1.87
VV12	93.4	1.81
VV13	70.8	1.85
VV14	71.4	1.84
VV15	96.4	1.93
VV16	101.0	1.94
VV17	96.7	1.82
VV18	105.6	1.85
VV19	99.8	1.82
VV20	78.6	1.84
VV21	59.4	1.83
VV22	85.3	1.82
VV23	78.4	1.83
VV24	91.2	1.91
VV25	68.5	1.88
VV26	71.6	1.90
VV27	83.2	1.85
VV28	82.3	1.79
VV29	75.8	1.96
VV30	53.6	1.77

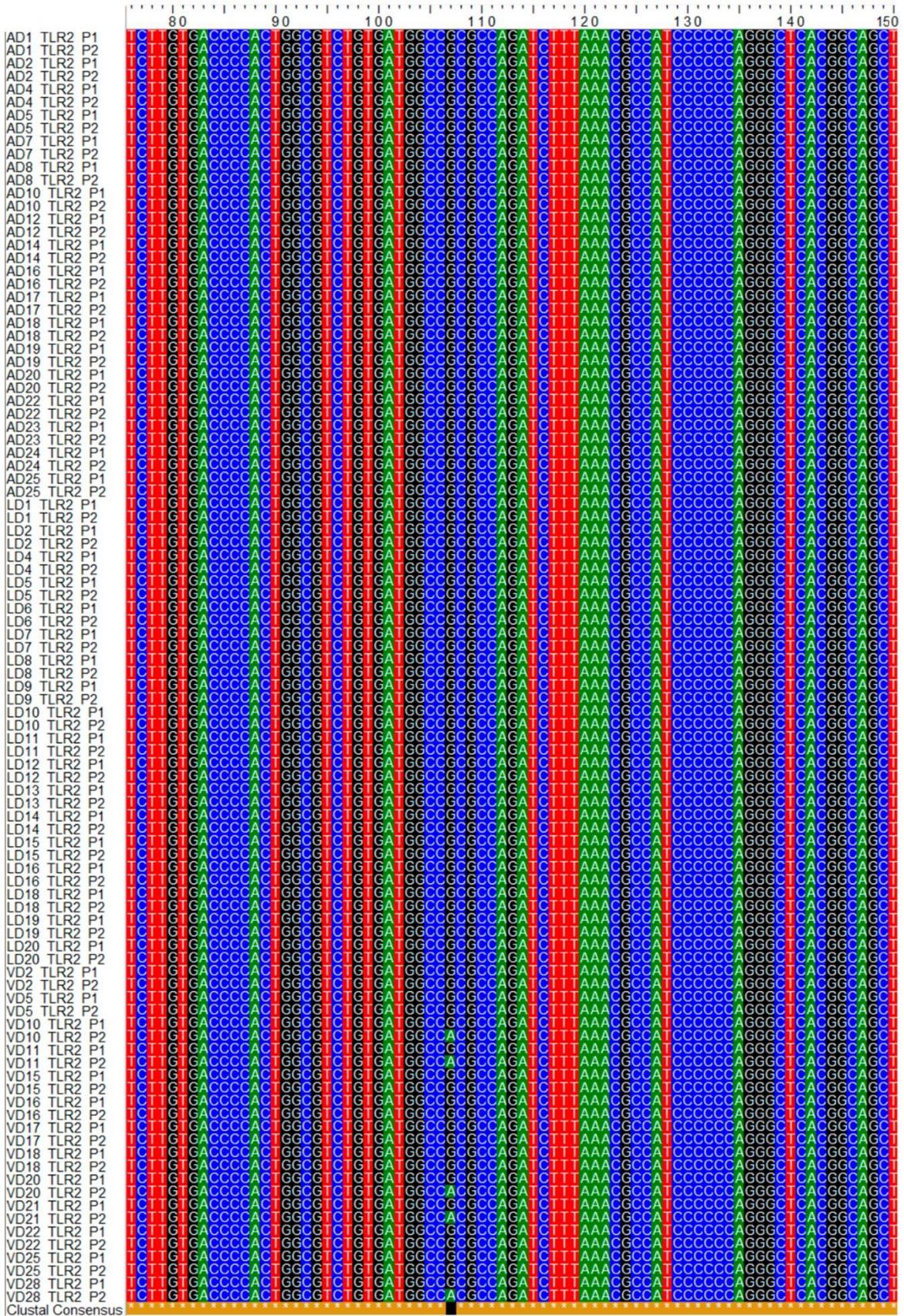
---

Anexo 4: Alineamiento múltiple para la región LRR del gen *TLR2*

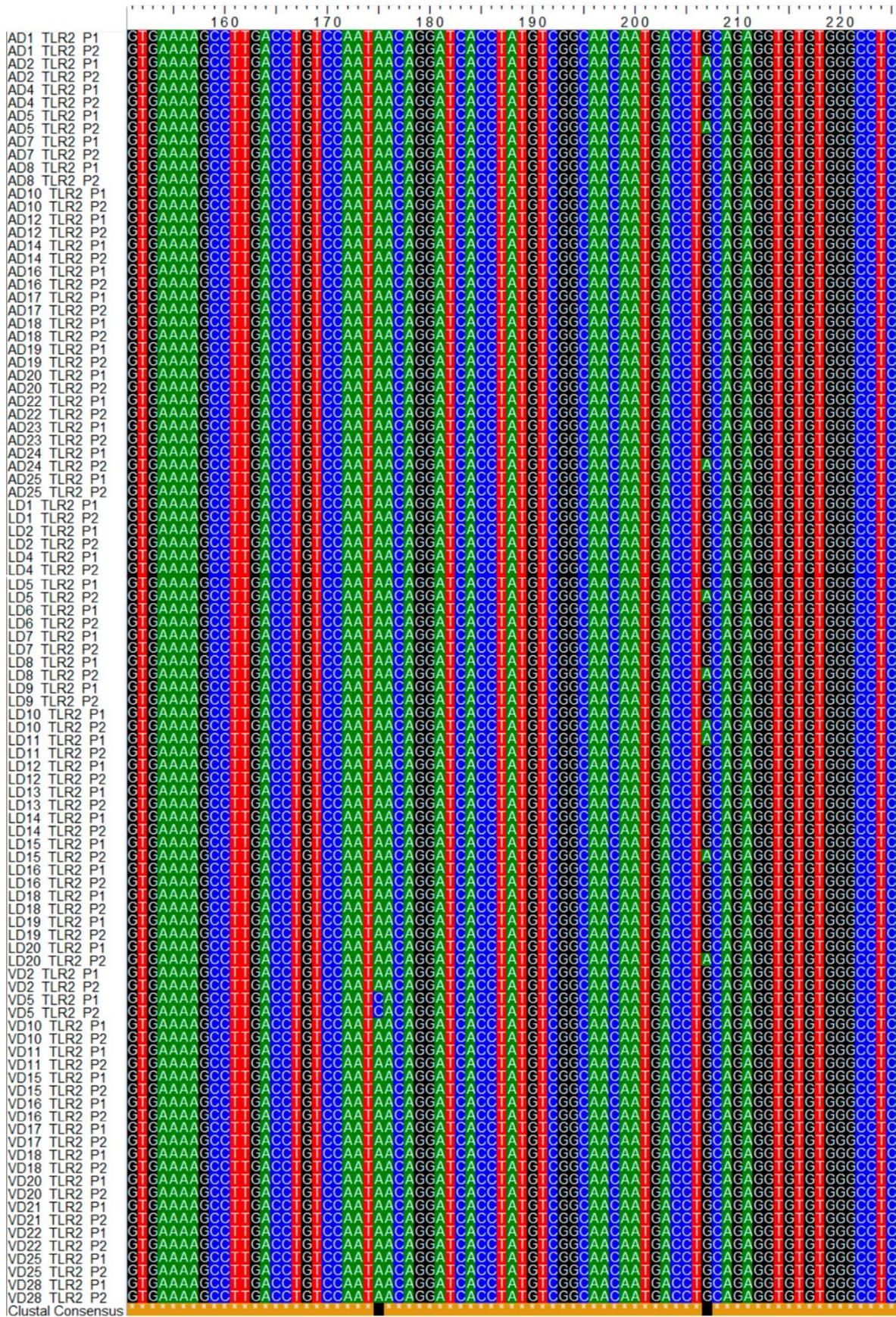
Posición 1-75



Posición 76-150

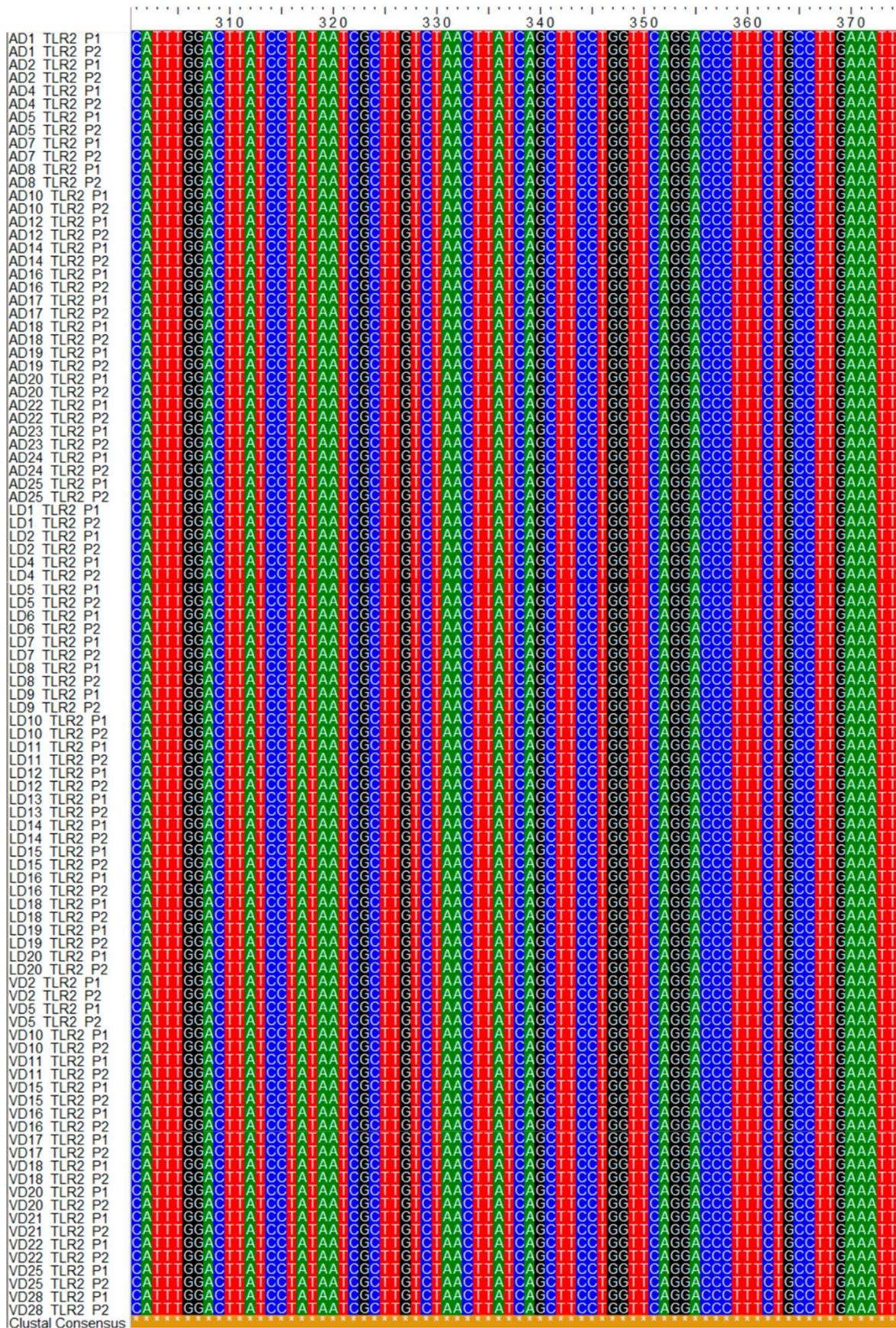


Posición 151-225

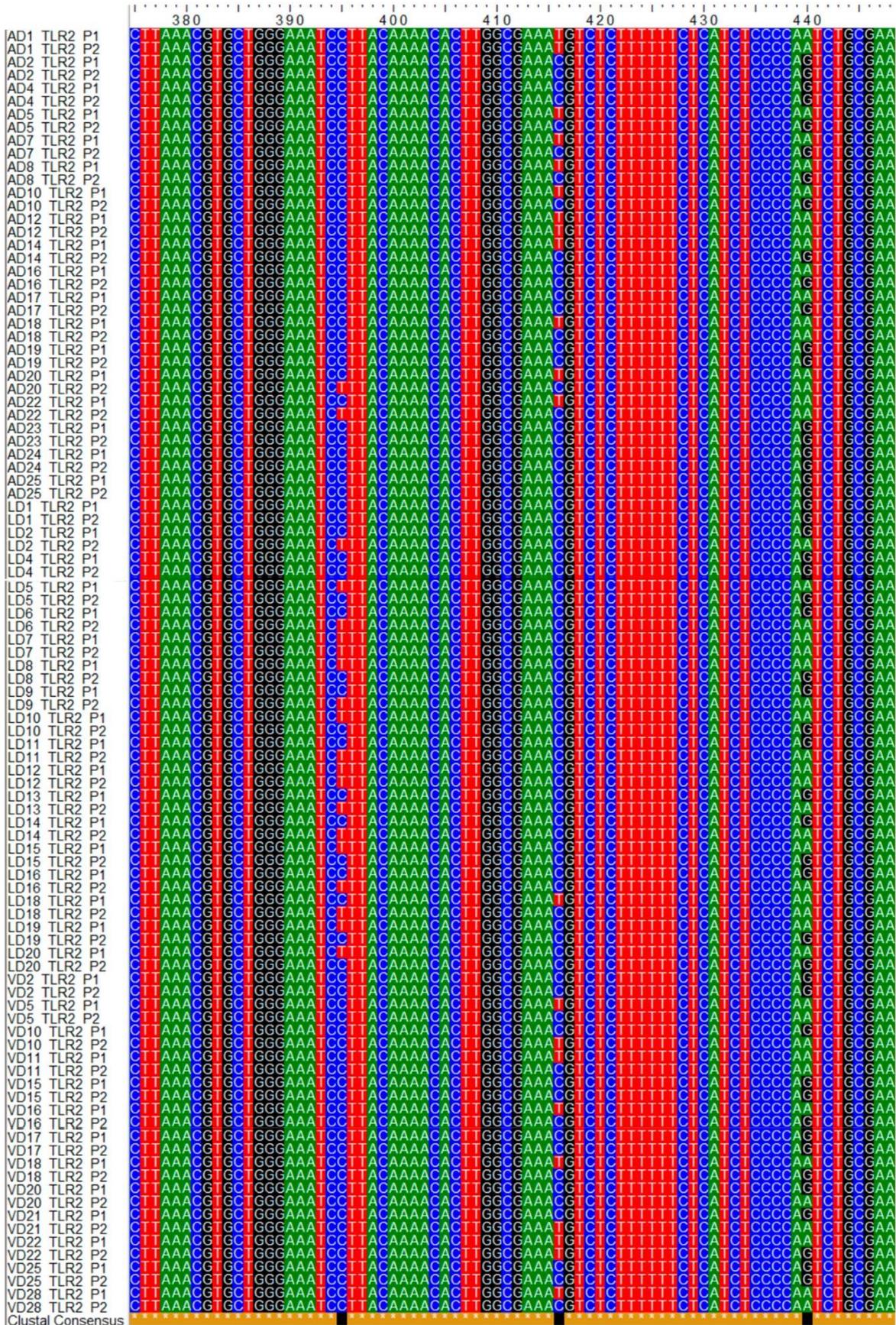




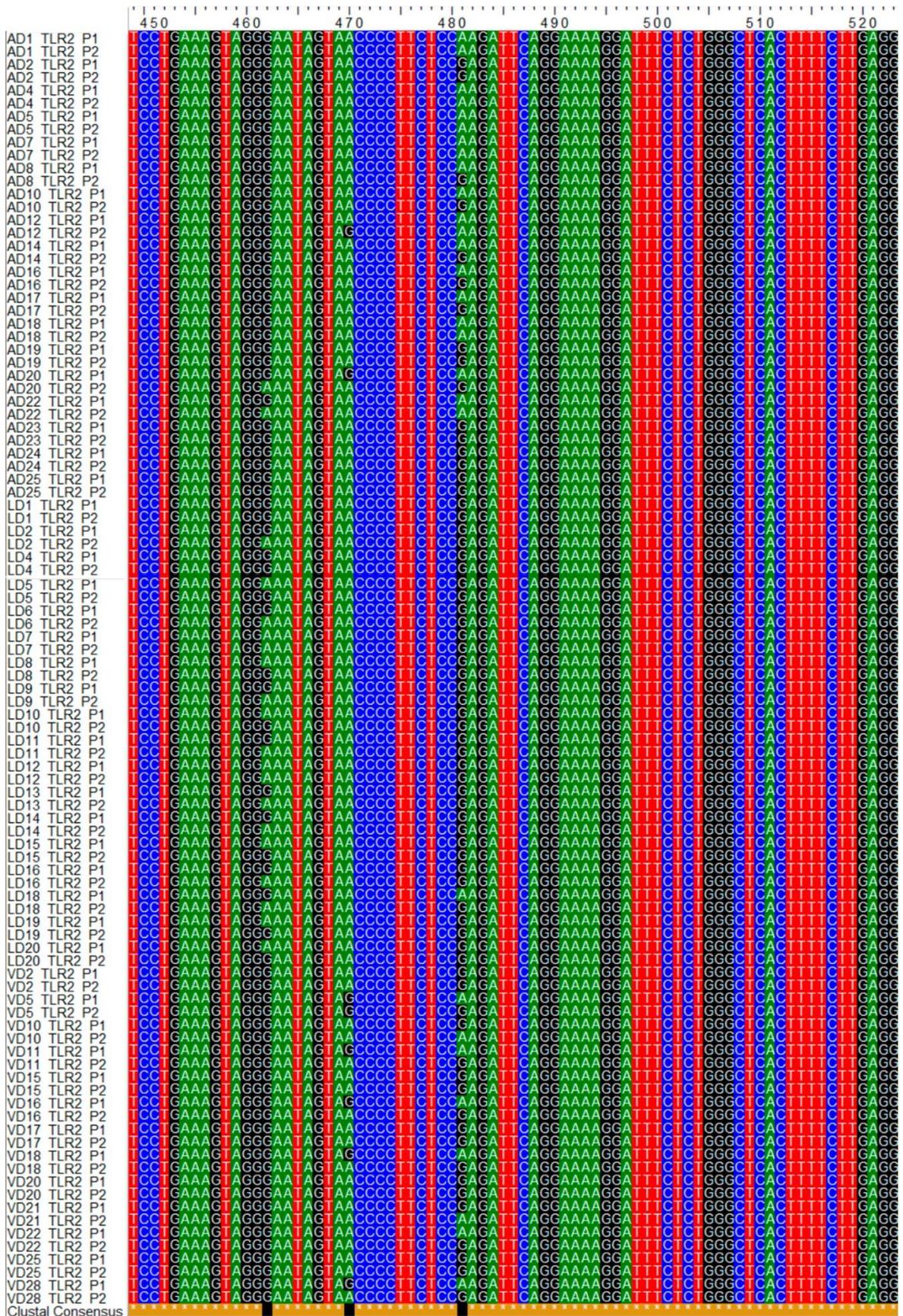
Posición 301-374



Posición 375-448



Posición 449-523





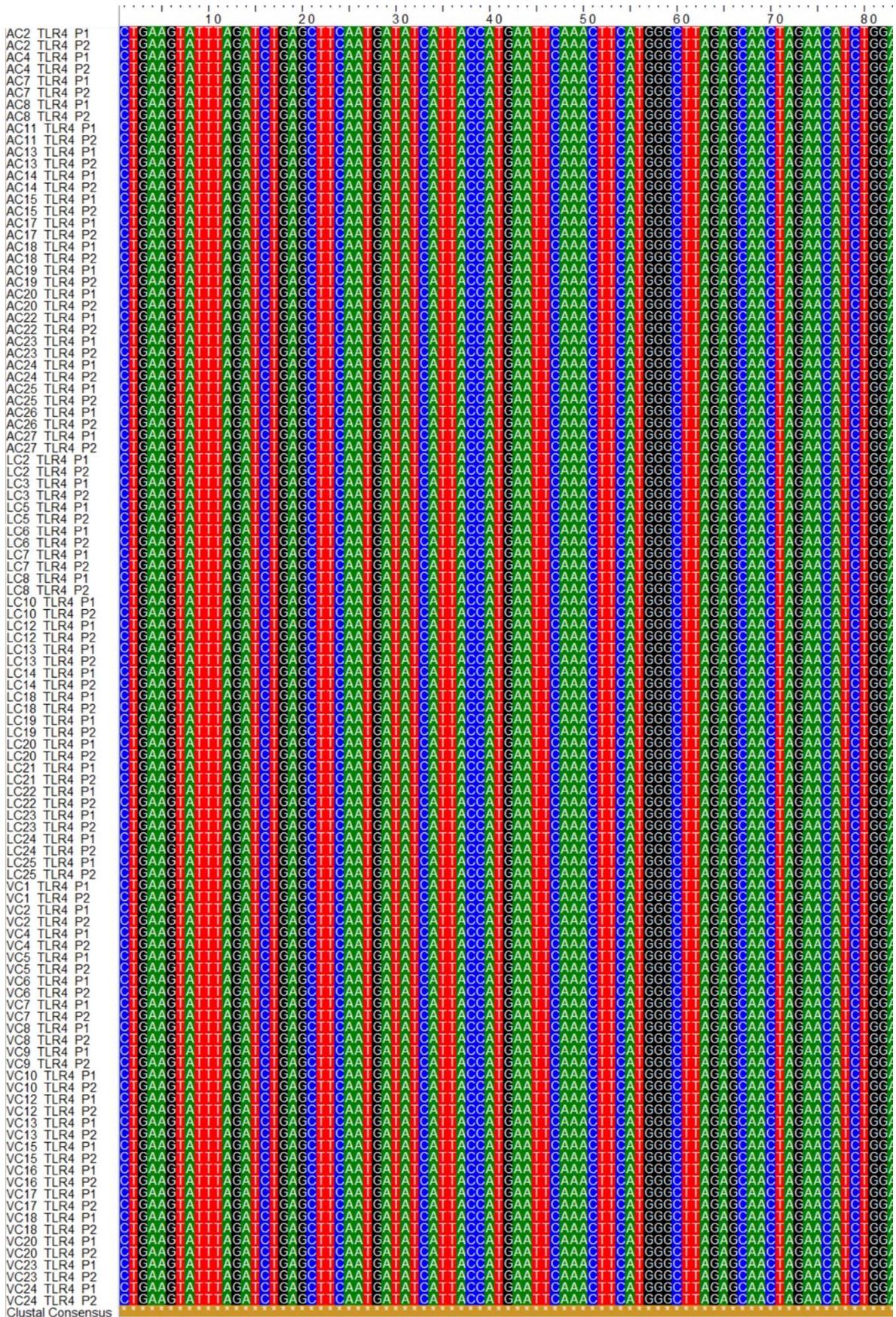
Posición 599-673



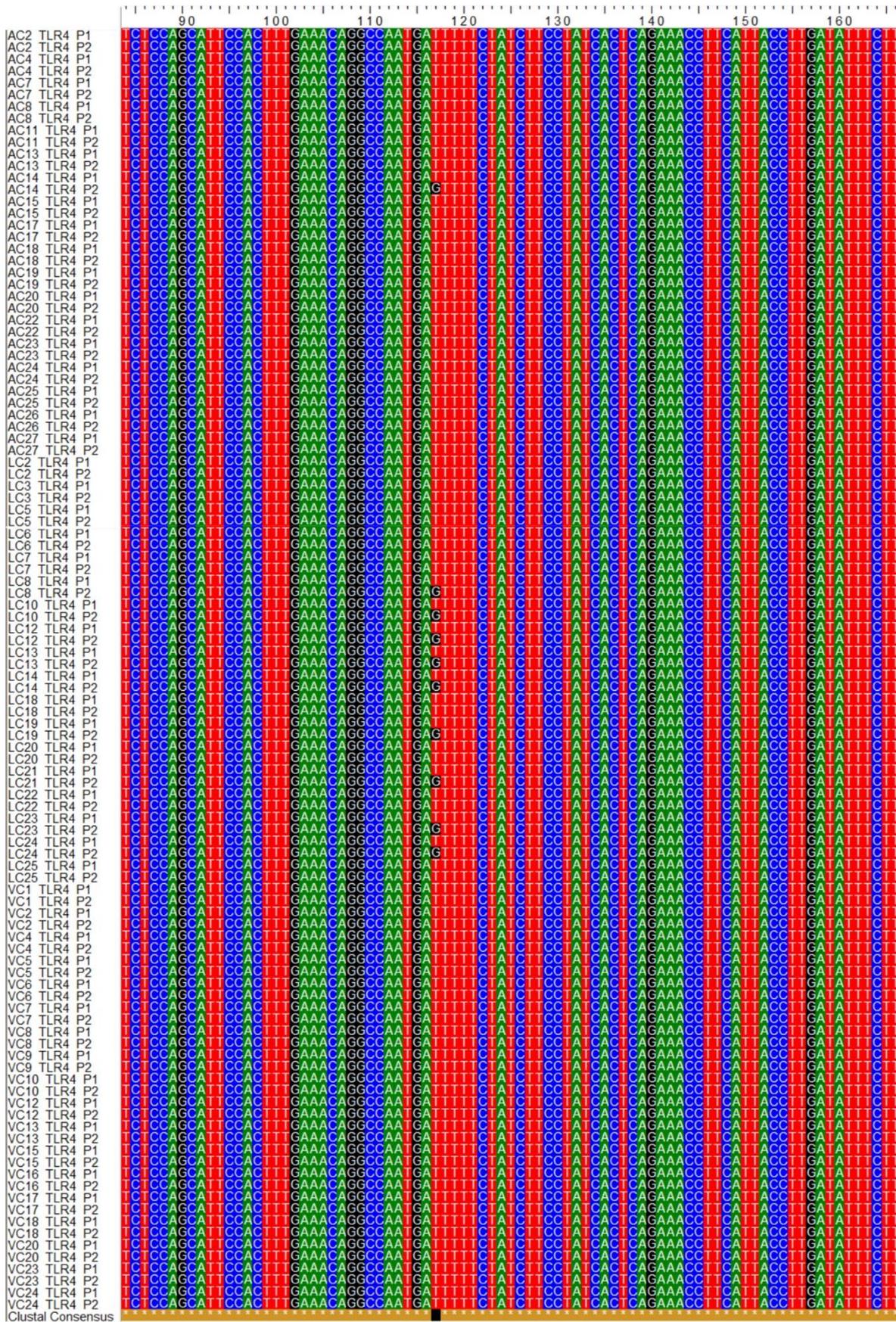


Anexo 5: Alineamiento múltiple para la región LRR del gen *TLR4*

Posición 1-83

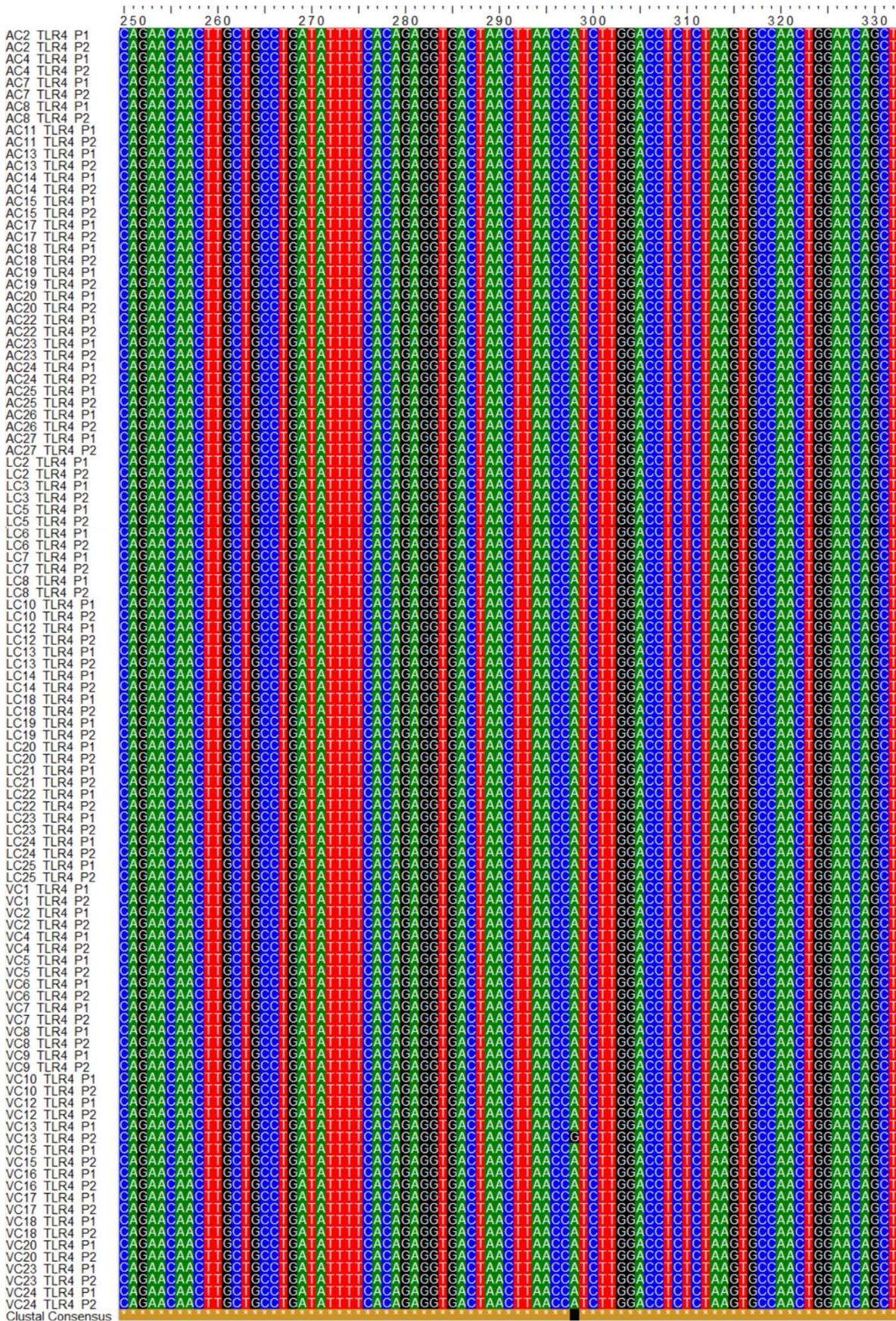


Posición 84-166





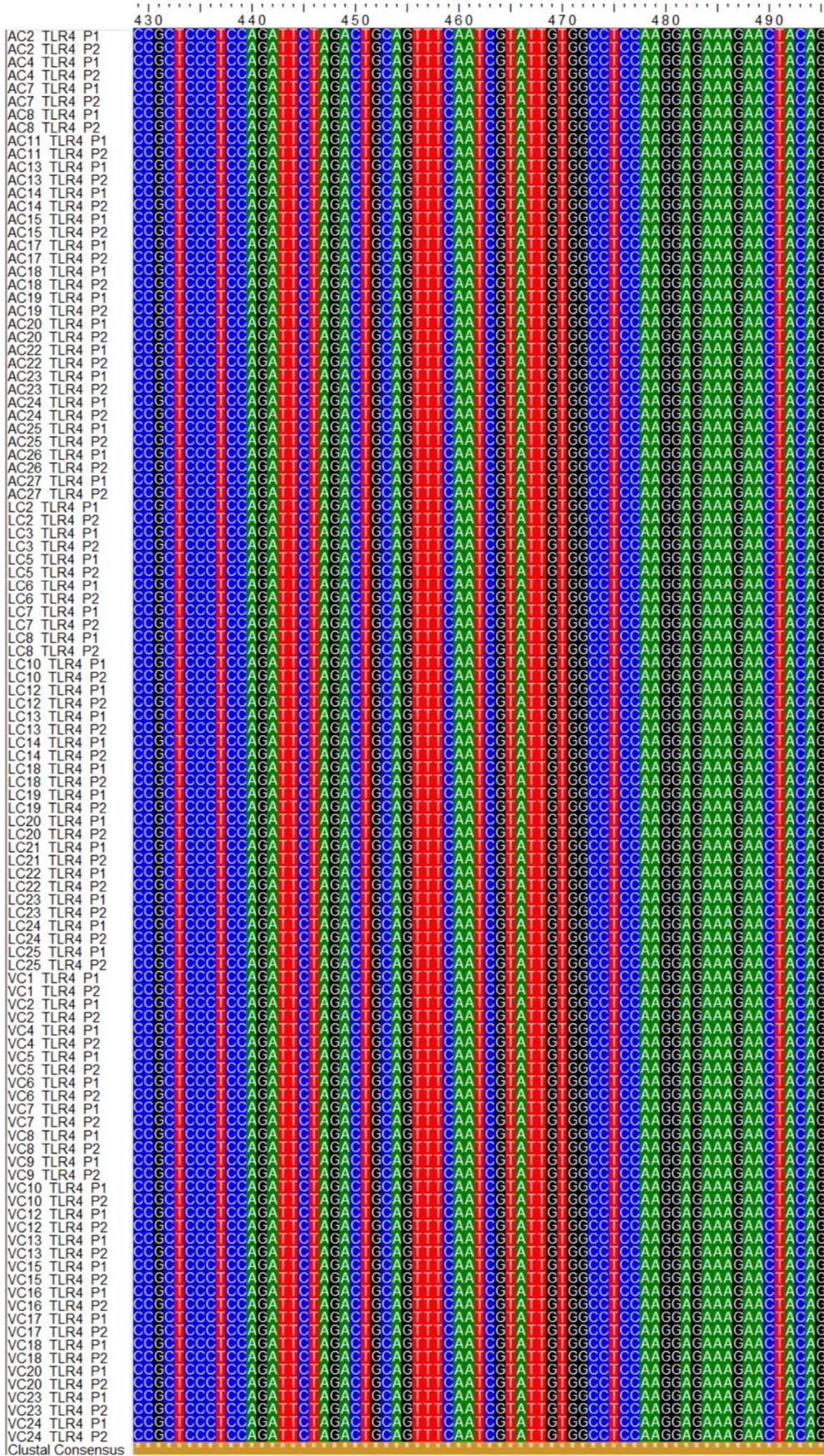
Posición 250-332



Posición 333-428

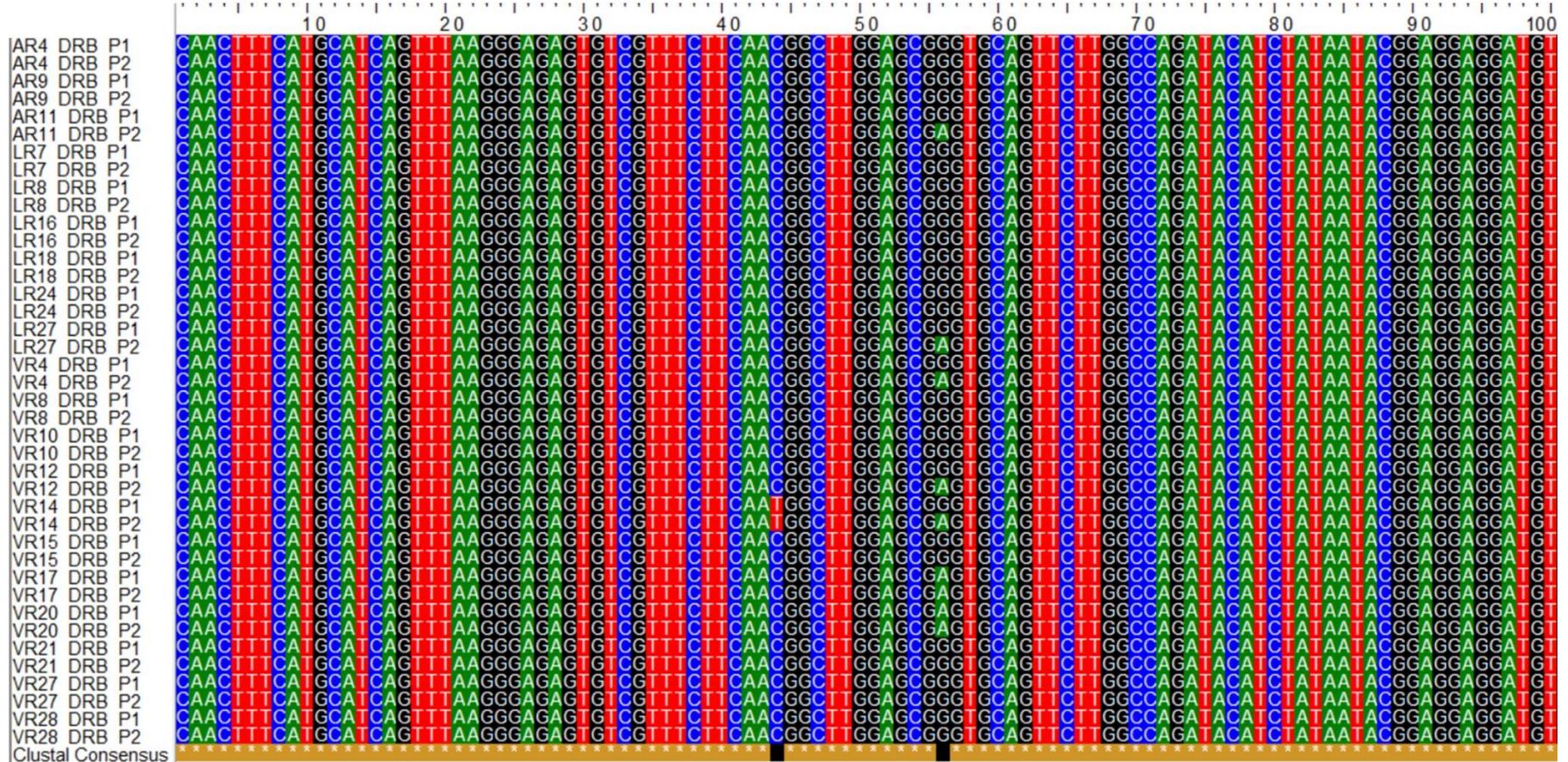


Posición 429-495



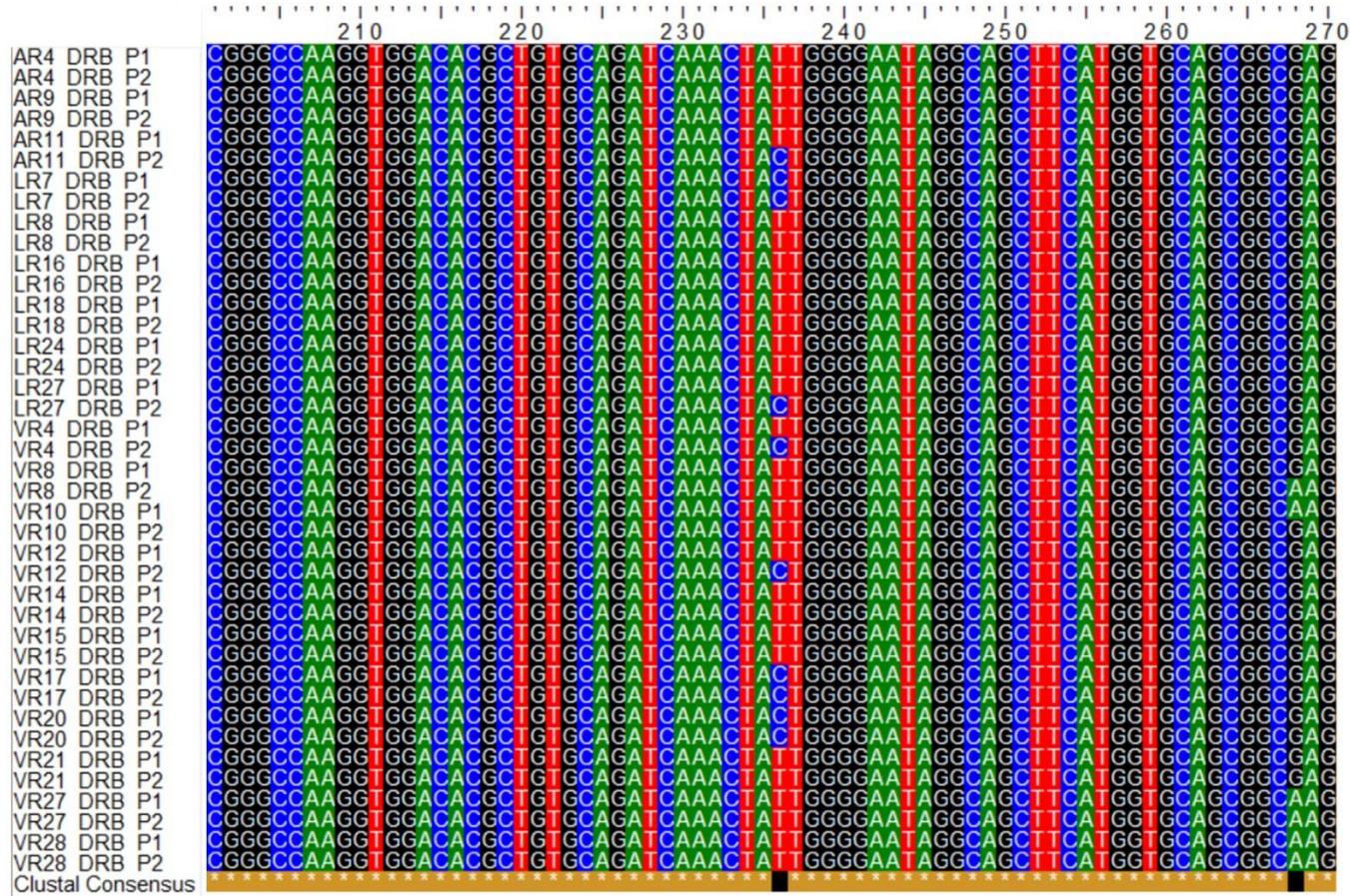
Anexo 6: Alineamiento múltiple para el exón 2 del gen *DRB1*

Posición 101-200



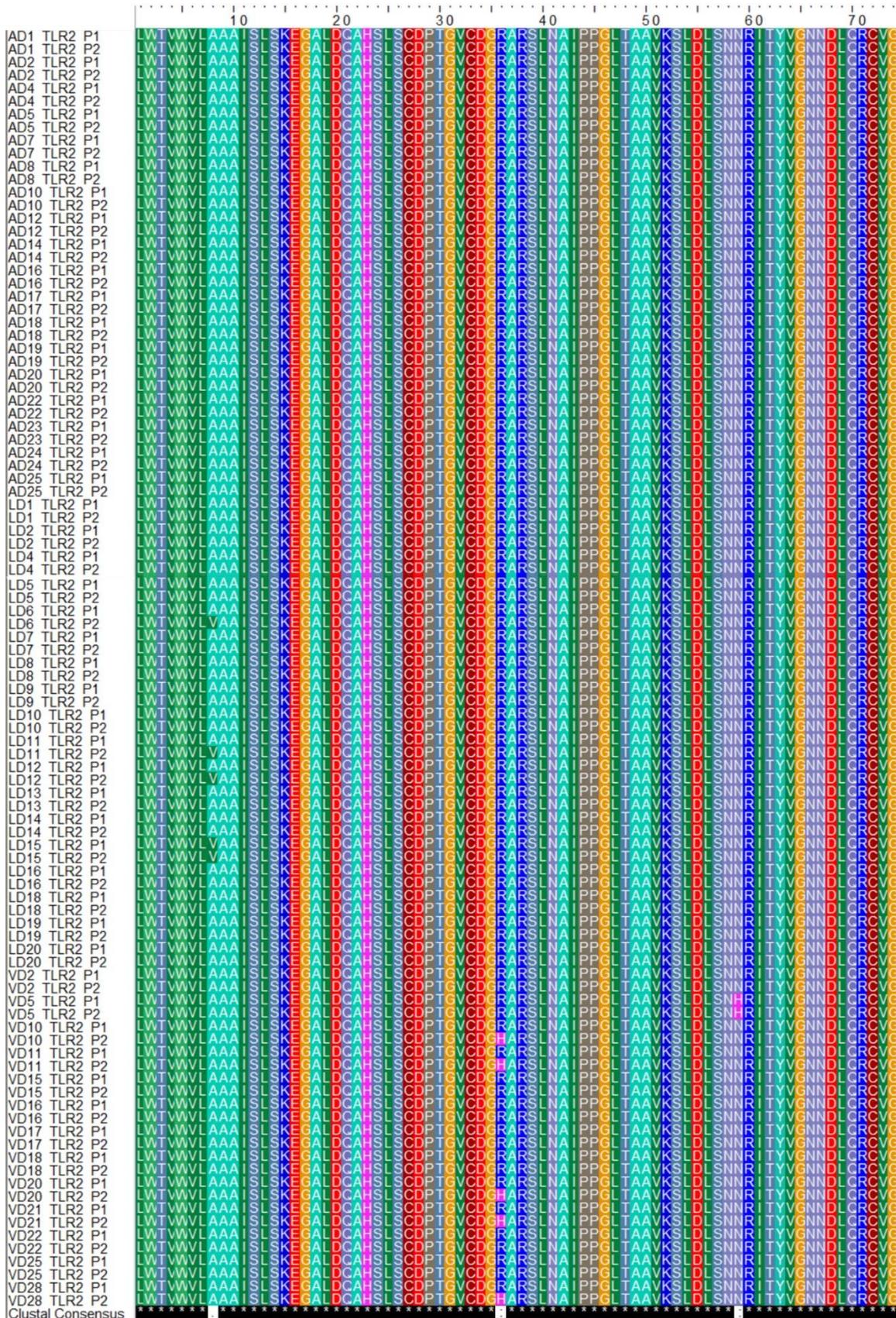


Posición 201-270



Anexo 7: Alineamiento múltiple de aminoácidos para la región LRR del gen *TLR2*

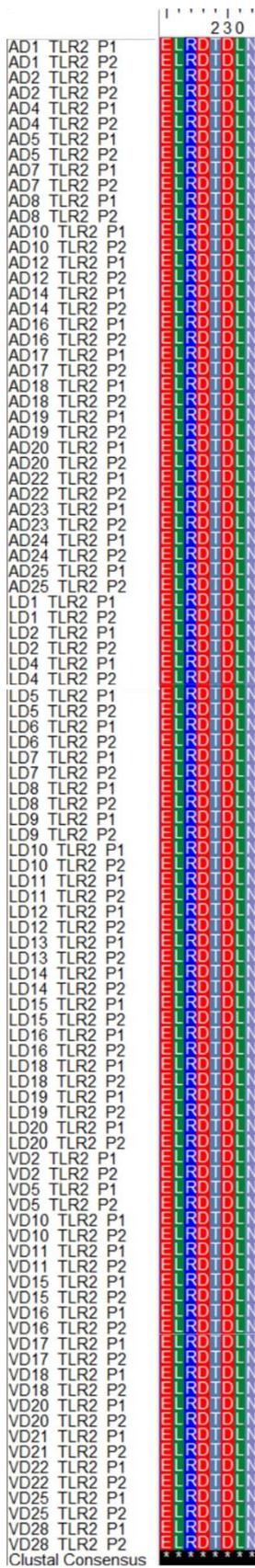
Posición 1-74







Posición 225-232





Posición 86-165

