



**Facultad de Ciencias Exactas  
Universidad Nacional de La Plata**

# **Análisis del ADN mitocondrial de Camélidos Sudamericanos (Tylopoda, Camelidae)**

**Bioq. Florencia Di Rocco**

**Trabajo de Tesis para optar al título de  
Doctor en Ciencias Exactas**

**Director: Dra. Lidia A. Vidal-Rioja  
Asesor Académico: Dr. Antonio Lagares**

**Instituto Multidisciplinario de Biología Celular (IMBICE)**

**2008**

## Agradecimientos

En primer lugar, quiero agradecer a los que hicieron posible la realización de esta tesis.

A las autoridades del IMBICE, por permitirme desarrollar mi trabajo en esta Institución.

A la Dra Vidal Rioja, que me acompañó en este trabajo y me alentó en los momentos que me encontré desanimada.

A Andrés Zambelli, a Bamba, a Silvina, a Cecilia, a Miriam y a Gisela, por haber participado de diferentes formas, en este trabajo.

A Gustavo Parisi, por la buena predisposición y ayuda. A Guillermo, por lo mismo.

Pocas veces uno tiene la oportunidad de agradecer a todas las personas que quiere, juntas. Debe ser por eso que, desde que empecé mi tesis, imaginé este momento. Espero, con todas mis limitaciones literarias, poder transmitir aunque sea un poco lo agradecida que me siento.

Gracias Bamba, por estar al lado mío siempre y por tu apoyo incondicional.

Gracias Papá, por enseñarme a disfrutar de estudiar y aprender, a vos va dedicada esta tesis.

Gracias mamá, por enseñarme que uno es realmente afortunado cuando encuentra un grupo humano como el que yo encontré en el IMBICE.

A Ceci, a Miri y a Lau M. por haberme acompañado, escuchado, consolado y divertido tantas veces. También a Lau G y a Romi (que se extraña mucho), por los mates y momentos compartidos.

A César, por su sabiduría y su buen humor a la mañana.

A Sil R, mi vecina, por su generosidad y amistad, por las charlas y las palabras justas en los momentos necesarios (o al revés).

A Dani, Anabela y Nahuel.

A los integrantes del laboratorio de Genética poblacional, por sus consejos y apoyo.

A las chicas B-B, especialmente a Rita por darme ánimo siempre.

A Hebe por haberme brindado su tiempo y sus consejos cuando lo he necesitado.

A Jorge LC por animar todas las reuniones y tener la capacidad de dar una clase de estadística divertida!

A Julia, Anita, a Olga y Gri. A mi compañera de viernes dulces, Mirta!

A Vero B, Betty, Vero L, Rubén, Miguel S, Laura D, Miguel B, por tantos favores.

Gracia a todos ustedes por haber compartido conmigo tantos buenos y malos momentos.

A mi amiga Silvia Rodriguez, por ser la persona que es y por estar siempre. Siento que un agradecimiento es muy poco para todo lo que le debo.

A todos los que mi trabajo nos ha hecho perder momentos juntos:

A mi tía Miriam

A todas mis amigas, Cele, Ro, Lau V, Pau, Mariana, Mariela, Yani, Pepa, Lore, Ceci M, María, Vero N

A mis hermanos que, aunque estén abajo en los agradecimientos, los quiero mucho.

A mis suegros y cuñados por recibirme en su familia.

Espero no haberme olvidado de alguien

A todos ustedes, de nuevo, gracias!

# Contenidos

Página

|  |    |
|--|----|
| <b>1. Introducción</b>   | 1  |
| 1.1 Origen y evolución de los camélidos sudamericanos  | 2  |
| 1.2 Hábitat de los camélidos sudamericanos   | 4  |
| 1.2.1 Adaptaciones fisiológicas a su hábitat   | 7  |
| 1.3 Rol de la mitocondria en la respuesta a la hipoxia   | 9  |
| 1.4 Estructura y organización de la mitocondria  | 10 |
| 1.4.1 ADN mitocondrial   | 10 |
| 1.4.2 Evolucion del ADN mitocondrial   | 13 |
| <b>2. Hipótesis y objetivos</b>  |    |
| 2.1 Hipótesis de trabajo   | 18 |
| 2.2 Objetivos generales  | 18 |
| 2.3 Objetivos específicos  | 19 |
| <b>3. Materiales y métodos</b>   |    |
| 3.1 Muestras   | 21 |
| 3.1.1 Extracción de ADN total  | 21 |
| 3.2 Amplificación y Secuenciación del genoma mitocondrial completo   | 21 |
| 3.2.1 Diseño de primers  | 21 |
| 3.2.2 Amplificación por PCR  | 22 |
| 3.2.3 Electroforesis en geles de agarosa   | 23 |
| 3.2.4 Secuenciación  | 23 |
| 3.3 Análisis de las secuencias obtenidas   | 23 |
| 3.3.1 Determinación de la organización y características generales del genoma mitocondrial del guanaco y la vicuña | 23 |
| 3.3.2 Comparación de los genomas del guanaco y la vicuña   | 23 |
| 3.3.3 Análisis de las proteínas de la cadena respiratoria  | 25 |
| 3.3.4 Modelado de la subunidad II del complejo citocromo oxidasa   | 27 |
| 3.3 Prueba de Tasas relativas de evolución de las proteínas  | 27 |
| 3.5 Tasas relativas de sustitución sinónima y no sinónima  | 28 |
| 3.6 Selección positiva   | 28 |
| <b>4. Resultados</b>   |    |
| 4.1 Secuencia de los genomas mitocondriales del guanaco y de la vicuña   | 31 |
| 4.1.2 Organización y características generales del genoma mitocondrial de camélidos                                | 31 |
| 4.1.2.1 Regiones no codificantes   | 32 |
| 4.1.2.2 Región codificante   | 34 |
| 4.2 Comparación de los genomas mitocondriales del guanaco y la vicuña  | 37 |
| <i>Genes codificantes de proteínas</i>   | 37 |
| <i>ARN de transferencia</i>  | 39 |
| <i>ARN ribosómicos 12S y 16S</i>   | 38 |
| 4.3 Características de las proteínas de la cadena respiratoria en camélidos  | 40 |

|   |     |
|---|-----|
| <i>Citocromo b</i>  | 40  |
| <i>Complejo NADH deshidrogenasa</i>                             | 42  |
| <i>Complejo citocromo c oxidasa</i>                             | 48  |
| <i>Complejo ATP sintasa</i>                                     | 51  |
| 4.4 Tasas relativas de evolución                                | 52  |
| <i>Resultados del Test de Tajima</i>                            | 52  |
| <i>Tasas relativas de sustitución nucleotídica en COII</i>      | 54  |
| <b>5. Discusión</b>   | 56  |
| Características del genoma mitocondrial del guanaco y la vicuña | 57  |
| Comparación de la región codificante                            | 59  |
| Rol del ADN mitocondrial en la adaptabilidad de los camélidos   | 61  |
| Sustituciones de aminoácidos halladas en los camélidos          | 63  |
| <i>Complejo NADH deshidrogenasa</i>                             | 63  |
| <i>Citocromo b</i>  | 67  |
| <i>Complejo ATP sintasa</i>                                     | 68  |
| <i>Complejo citocromo c oxidasa</i>                             | 69  |
| <b>Conclusiones</b>   | 73  |
| <b>Bibliografía</b>   | 76  |
| <b>Material suplementario</b>                                   | 88  |
| Anexo I   | 89  |
| Anexo II  | 102 |

**1.**

## **INTRODUCCION**

### 1.1 Origen y evolución de los camélidos sudamericanos

En la clasificación sistemática de los mamíferos el orden Artiodactyla tradicionalmente se divide en tres subórdenes: Suina (cerdos, pecaríes), Tylopoda (familia Camelidae) y Ruminantia (bóvidos, ciervos, jirafa). Estudios de filogenia y evolución molecular realizados durante la última década llevaron a Montgelard y col (1997) a proponer el reconocimiento de un orden monofilético superior denominado Cetartiodáctila y constituido por los ordenes Artiodactyla + Cetácea (ballenas y delfines). Esta propuesta fue adoptada por distintos autores entre los que se destaca el grupo de Ulfur Arnason et al. (Ursing y Arnason, 1998; Arnason y col, 2000; Arnason y col, 2004) quien, a través de sus estudios en cetáceos, amplió los fundamentos para la nueva nomenclatura.

La familia Camelidae está compuesta por los Camélidos Sudamericanos (CS) y los Camellos del Viejo Mundo (CVM). En Sudamérica la familia Camelidae, comprende los géneros Lama y Vicugna representados por las especies silvestres guanaco y vicuña y las domésticas llama y alpaca. En Asia y África el género Camelus abarca las especies domésticas camello bactriano y dromedario.

Los camélidos ancestrales aparecieron en el Mioceno tardío siendo una de las primeras familias modernas de artiodáctilos. Su origen tuvo lugar en el centro de América del Norte donde ocurrió la mayor parte de sus 40- 45 millones de años de evolución (Franklin, 1982). Hace unos 3 millones de años, durante el Plioceno, se produjo la dispersión de los camélidos quienes migraron a través del estrecho de Bering a Eurasia donde se diseminaron rápidamente a lo largo del cinturón seco de este continente y continuaron hacia el sur hasta la región alrededor del Mediterráneo y el Este de África, y hacia el este, el desierto de Gobi y China. Posteriormente, en el Viejo Mundo los camellos se diferenciaron en las especies actuales *Camelus bactrianus* de las estepas y montañas de Mongolia y *Camelus dromedarius* de los desiertos del sudoeste de Asia y del norte de África. Mientras tanto, a comienzos del Pleistoceno, la formación del istmo de Panamá permitió el intercambio de fauna entre América del Norte y América del sur, incluyendo la invasión del camélido Hemiauquenia en los Andes y las pampas de Sudamérica. Hacia el final del Pleistoceno (hace 10.000 a 12.000 años) los géneros Hemiauquenia y Paleolama se extinguieron (Webb

1974) ocurriendo lo mismo con todos los camélidos de América del Norte. Los eventos evolutivos posteriores de los camélidos sudamericanos (CS) son poco conocidos debido a lo escaso del registro fósil, pero se cree que el género extinto *Paleolama* y el actual *Lama* (guanaco) se diferenciaron a partir de un antecesor común desconocido. La vicuña probablemente también se diferenció al mismo tiempo a partir del mismo antecesor pero de un linaje distinto al de *Lama*. El origen evolutivo de las formas sudamericanas parece haber sido las montañas andinas donde sus patas cortas les permitían una mejor adaptación al salto y marcha en terreno escabroso (Franklin 1982)

La evidencia mas temprana de domesticación de los CS proviene de sitios arqueológicos localizados entre 4000 y 4900 m de elevación, en la puna de los andes peruanos. Tanto el guanaco como la vicuña han habitado esta tundra por aproximadamente 12000 años y fueron, junto con el huemul, las presas principales del antiguo hombre americano (Wheeler 2003). El origen de los camélidos domésticos llama y alpaca es aún un tema controversial. Evidencias dentarias, halladas en Telarmachay y en otros sitios arqueológicos, llevaron a Wheeler, (1982,1991) a sugerir que la llama descende del guanaco y la alpaca de la vicuña. Estas conclusiones fueron también apoyadas por Darwin (1868), Faige (1929), Stanley y col (1994) y Semorile y col, (1994). Otros autores han sugerido que ambas formas domésticas derivan del guanaco y que la vicuña no fue nunca domesticada (Thomas,1891; Cook ,1925 ;Weber ,1928), Esta ultima hipótesis fue también apoyada por estudios de morfología craneana y del tamaño del cerebro en relación al peso corporal (Herre y Rohrs 1973; Krushka 1982) y por los datos del análisis de la secuencia de aminoácidos de la hemoglobina de las cuatro especies sudamericanas ( Jurguens y col 1988; Picchini y col, 1990) Investigaciones sobre el comportamiento de los camélidos también han producido hipótesis contradictorias en cuanto a los orígenes de la llama y la alpaca (Krimbiegel 1952; Hemer, 1990). Las observaciones de Vidal Rioja y col (1994) y de Saluda-Gorjul, Jaworski y Greger (1990) sobre ADN satélite, y los estudios de la secuencia de citocromo b de Stanley y col (1994) sugieren además la ocurrencia de hibridización entre las especies domésticas. Estudios recientes de la fibra de llamas y alpacas momificadas sugieren que la hibridación post conquista ha modificado las características

de las poblaciones actuales, lo que podría explicar la diversidad de conclusiones en cuanto a la ancestría de los camélidos domésticos.

Tanto los camélidos sudamericanos silvestres como domésticos poseen el mismo cariotipo  $2n=74$  (Capanna y Civatelli, 1968) por lo que pueden, bajo la influencia del hombre, producir híbridos fértiles (Gray, 1954; Hsu y Benirschke 1967; Cabrera y Yepes 1960; Cardozo ,1954; Fernández Baca ,1971). Estudios del gen mitocondrial citocromo b (Stanley y col, 1994, Kadwell y col, 2001) no aportaron evidencia sobre la ocurrencia de hibridización entre las especies silvestres guanaco y vicuña y por tanto avalan la hipótesis de que Lama y Vicugna son géneros diferentes cuya divergencia comenzó hace 2-3 Ma.

La comparación de genomas mitocondriales completos se viene utilizando en los últimos años en estudios de y entre distintos órdenes de mamíferos (Arnason y Johnson, 1992; Ursing y Arnason, 1998; Janke y col, 1997). Estas comparaciones, además de ser útiles en la determinación de las relaciones a nivel de Orden, contribuyen también a dilucidar las relaciones genéticas entre especies cercanas y en particular a determinar el grado de diferenciación entre especies que todavía tienen compatibilidad reproductiva (Arnason y Gulberg, 1993). Este es el caso de las especies silvestres guanaco y vicuña, de las cuales el genoma mitocondrial completo no se conoce.

## **1.2 Hábitat de los camélidos sudamericanos**

Los CS domésticos y los silvestres son los mamíferos herbívoros dominantes de una zona de pastoreo ubicada entre 3900 y 4600 m de altitud en la Puna andina. Esta región se encuentra en las elevaciones andinas del centro de Perú, al oeste de Bolivia, noroeste de Argentina y norte de Chile. Por su altitud y cercanía al Ecuador la Puna es una zona biológica única que se encuentra entre la línea de árboles y la de nieve. Su topografía consiste en grandes planicies, anchos valles, lomas planas, colinas onduladas, acantilados rocosos y picos dentados. El clima es frío, seco y casi siempre ventoso. Por otra parte, las secas laderas andinas y la ventosa Patagonia también son hábitat de los CS particularmente del guanaco y en menor cuantía de la vicuña y la llama.



El guanaco es la especie con distribución mas amplia siendo, entre todos los CS el ocupante de la mayor variedad de hábitats. Se encuentran poblaciones de esta especie en la vertiente occidental y zonas costeras de los Andes del norte de Perú y centro de Chile, en la pendiente oriental seca de los Andes del sur a lo largo de la Patagonia en Argentina y en la isla de Tierra del Fuego. A pesar de su afinidad por hábitats secos y abiertos su particular adaptabilidad le permite además habitar ambientes tan disímiles como el desierto de Atacama, uno de los más secos del mundo y el húmedo archipiélago fueguino así como también ocupar desde la planicie hasta los 4200 m sobre el nivel del mar (Franklin 1975,1982, Raedeke 1979).

La distribución actual de la vicuña está limitada a áreas de extrema elevación (3700-4800m) en los Andes aunque la evidencia paleontológica sugiere que el género *Vicugna* podría haberse originado mas hacia el este, en las planicies Argentinas, hace dos millones de años (López Aranguren 1930; Cabrera 1932; Web1974; Harrison 1985). Menegaz (1989) por otro lado, sugiere que la vicuña evolucionó a partir del guanaco a comienzos del Holoceno. Sin embargo, datos mas recientes de secuencias de ADN mitocondrial sostienen una divergencia de las dos especies de al menos dos millones de años (Stanley y col ,1994). Por otra parte, restos fósiles de vicuña encontrados en Tarija (Bolivia) y datados entre 7300 y 9400 años atrás (Hofstetter, 1986) indican que en ese momento su rango se había expandido hacia el oeste de los Andes. Sin embargo, recién con el fin de la glaciación del Pleistoceno y el establecimiento de las actuales condiciones climáticas del Holoceno, hace 9000 a 12000 años, *Vicugna* se trasladó a su actual hábitat de la Puna andina (Hofstetter, 1986)

A diferencia de otros mamíferos herbívoros pastoreadores los camélidos sudamericanos que habitan regiones andinas de gran altitud, deben convivir con temperaturas y aridez extremas. Una de las características que favorecen su adaptación al severo clima de la Puna es su fino y abundante pelaje aislante (11-14 micrones de diámetro). Algunos autores sostienen que la distribución geográfica y ecológica del guanaco y la vicuña están altitudinalmente relacionadas, aunque no hay evidencias claras de esto. Estas dos especies se encuentran juntas para varios autores, aunque Osgood (1916) indica que "guanacos y vicuñas se encuentran en las mismas montañas, pero nunca juntos" y que los guanacos se distribuyen desde el

nivel del mar hasta los 4000 m "cubriendo de esa forma las regiones del altiplano debajo del hábitat de la vicuña" (Miller y col 1973). Según Franklin (1982) existen dos áreas con poblaciones de guanaco y de vicuña viviendo en proximidad. Una es la Reserva Nacional de vicuñas en Pampa Galeras, en el sur de Perú, y la otra es la Reserva Nacional de San Guillermo de San Juan, Argentina. En ambos casos la distribución del guanaco termina y la vicuña comienza mostrando, en la zona de transición, comunidades desde las tierras bajas hasta las montañas de 4000 m de altitud. De esa forma la vicuña utiliza las pasturas más altas mientras que el guanaco ocupa la zona montañosa baja y desértica

La llama es el más grande de los CS domésticos y, al igual que el guanaco, está adaptada a un amplio rango de ambientes. Después de su domesticación en la Puna peruana hace 6000-7000 años, la llama fue trasladada a zonas más bajas en los valles interandinos y el norte de Chile y posteriormente a la costa de Perú y Ecuador. La llegada de los españoles durante la colonización americana tuvo un gran impacto en la fauna andina nativa. Existen documentos que registran la desaparición de aproximadamente el 90 % de los camélidos domésticos (Flores Ochoa, 1982) Los primeros en desaparecer fueron animales que habitaban la costa y los valles interandinos debido a la usurpación de las tierras de pastoreo para la producción de ovejas, cabras, vacas y cerdos. En la Puna este proceso fue más lento porque tanto los españoles como su ganado, encontraron inhóspitos el duro clima y la extrema elevación. El ganado nativo y sus criadores se refugiaron en esta zona y sus descendientes continuaron habitando las mismas regiones marginales. Actualmente se encuentran llamas desde Colombia y Ecuador hasta el centro de Chile y centro-oeste argentino.

La alpaca es más pequeña que la llama y al igual que esta última su distribución ha sido influenciada por el hombre. Actualmente es, de las cuatro especies de camélidos, la que en América del Sur tiene el rango de distribución más restringido, localizándose principalmente en las grandes altitudes andinas (4400-4800 m) de Perú y Bolivia y en número mucho menor en el norte de Chile.

### **1.2.1 Adaptaciones fisiológicas de los camélidos a su hábitat**

El balance entre la demanda y el suministro de O<sub>2</sub> es crítico para el metabolismo celular y la supervivencia de los organismos aeróbicos. Los animales emplean varios mecanismos para mantener el balance metabólico en situaciones de déficit de oxígeno

Por ejemplo, la eritropoyetina (EPO) y el factor de crecimiento endotelial (VEGFA) se inducen para incrementar el transporte de O<sub>2</sub> y ayudar de esa forma a compensar el deficiente suministro (Zhang y col, 1999; Kimura y col, 2000). Generalmente, estas respuestas fisiológicas al estímulo de la hipoxia ocurren mediante la expresión de genes que ayudan a mantener la homeostasis. La disminución de los niveles de expresión de los genes que codifican enzimas de la cadena respiratoria (Vijayasathy y col, 2003; David y Poyton, 2005) y el incremento de expresión de genes para las enzimas glicolíticas (Semensa y col 1994) son algunos de los mecanismos involucrados.

En los camélidos, se han descrito numerosas adaptaciones fisiológicas a las bajas presiones de oxígeno (PO<sub>2</sub>) de su hábitat. Hotchachka y col, (1982) observaron que la capacidad oxidativa cardíaca de la llama, la alpaca y la de la taruca (especie de ciervo adaptado a vivir en alturas cercanas a los 5000 m), está notablemente elevada cuando se la compara con otras especies de mamíferos. Evaluaciones de la actividad de las enzimas lactato deshidrogenasa (LDH), citrato sintasa, (CS) e hidroxilCoA y de sus relaciones mostraron, en los camélidos, un aumento de la capacidad oxidativa preferencialmente basada en ácidos grasos. Estos autores también encontraron, en concordancia con estudios previos, (Bancharo y col 1971, Reynafarje y col, 1975) que estas especies presentan adaptaciones en las funciones de transporte de O<sub>2</sub> tales como baja viscosidad y una curva de disociación de O<sub>2</sub> peculiar que les proporciona una gran afinidad de la hemoglobina por el O<sub>2</sub> a nivel de los pulmones y la liberación del O<sub>2</sub> en los tejidos con una facilidad similar a la del hombre

Comparando las secuencias de aminoácidos de la hemoglobina (Hb) y su perfil de hidrofobicidad-hidrofilicidad en 16 especies de mamíferos, Bogner y col (1998) hallaron en los camélidos un número de aminoácidos cargados mayor que en el resto de los animales. Además, observaron que en los camélidos estas proteínas son más hidrofílicas que en el resto. En el mismo

estudio se investigó el comportamiento osmótico de los eritrocitos encontrándose, también en los camélidos, el más bajo contenido de agua de estos elementos y la mayor fracción de agua osmóticamente inactiva (unida). Estos autores proponen que las diferencias encontradas en las Hb de los camélidos, probablemente son el resultado de mecanismos evolutivos de adaptación. El incremento de hidrofiliidad de la Hb y mayor resistencia a la deshidratación osmótica se debería a un aumento de aminoácidos cargados. Estos mecanismos a nivel celular-molecular se sumarían a los mecanismos regulatorios fisiológicos que permiten la supervivencia de los animales en climas desérticos.

Fowler y Zinkl (1989) determinaron parámetros hematológicos y séricos en llamas y los compararon con los de caballos y vacas. Los resultados de este trabajo mostraron que los eritrocitos de las llamas son pequeños, elípticos y más numerosos ( $10.1$  a  $17.3 \times 10^6 / \mu\text{l}$ ) comparados con otras especies y que la concentración de Hb corpuscular media también es más alta. Dentro de los parámetros sericos, los valores de las hormonas tiroideas son 10 veces más altos que en otros animales domésticos. Estos autores sugieren que la variación de estos valores es de acuerdo a factores geográficos (altitudinal y latitudinal) y de disponibilidad de alimento

Una de las características del ambiente gestacional es la baja presión de oxígeno que existe desde la concepción y persiste a lo largo de la implantación del embrión y la placentación temprana (Leese, 1991). Bancroft (1946), describe a este ambiente como un "Everest in útero" tratando de reflejar las características compartidas, respecto de la limitación de oxígeno, entre las adaptaciones a grandes altitudes y el desarrollo fetal.

Estudios realizados en fetos de oveja y llama mostraron en estos últimos una concentración plasmática de hormonas vasoconstrictoras mucho mayor en respuesta a la hipoxia (Llanos y col, 2003). También, contrastando con lo que ocurre en fetos ovinos y humanos, el feto de llama mostró un incremento del flujo de sangre cerebral durante la hipoxia aguda, sin incremento en la extracción de oxígeno en ese órgano disminuyendo, de esa forma, el consumo de oxígeno del cerebro. Estos resultados sugieren que el feto de llama responde a la hipoxia aguda con hipometabolismo. Los mismos autores sostienen que la exposición de los camélidos durante millones de años a las bajas presiones de oxígeno del altiplano andino,

puede haber seleccionado genes que expresen mecanismos eficientes de adaptación a la hipoxia los cuales actualmente persisten en los camélidos que habitan a nivel del mar.

### **1.3 Rol de la mitocondria en la respuesta a la Hipoxia**

En distintas situaciones de hipoxia, además de las adaptaciones fisiológicas con aumento del número de glóbulos rojos y de la afinidad de la hemoglobina por el oxígeno (Llanos y col, 2003), se han descrito cambios tanto en el número de mitocondrias por célula como en los mecanismos moleculares involucrados en la producción de ATP (Hoppeler y col. 2003). Sin embargo, los mecanismos biológicos y genéticos subyacentes a la adaptación del hombre y varios animales a vivir en las alturas aún no han sido completamente dilucidados.

A partir del aislamiento y caracterización de la isoforma mitocondrial óxido nítrico sintasa (Giulivi y col, 1998), se planteó la posibilidad de que la fosforilación oxidativa (OXPHOS) pueda ser regulada activamente por la síntesis mitocondrial de óxido nítrico (NO), en respuesta a un amplio rango de estímulos fisiológicos, incluida la hipoxia (Land, 2004). El NO puede regular la OXPHOS a través de la inhibición reversible de la actividad de citocromo oxidasa (Wainio, 1955). Estudios recientes, en una línea celular murina de macrófagos mostraron, durante la hipoxia, una disminución coordinada de la expresión de genes mitocondriales y nucleares de COX (Vijayasarathy y col, 2003, Burke y Poyton, 1998) además de cambios en la actividad catalítica de la enzima.

Como dijimos anteriormente, las células de mamíferos son capaces de detectar una disminución de la disponibilidad de O<sub>2</sub> y activar repuestas adaptativas incluyendo la activación transcripcional de genes inducibles por la hipoxia, tales como EPO y VEGFA, además de enzimas glicolíticas. Estos procesos permiten incrementar el suministro de O<sub>2</sub> mediante el aumento de la eritropoyesis, de la angiogénesis y de adaptaciones metabólicas que facilitan la producción glicolítica de ATP (Burke y Poyton, 1996). La activación transcripcional del gen EPO es controlada mediante un elemento activador situado en la región 3' del gen, el cual requiere la unión de un factor específico de transcripción inducible por la hipoxia (HIF-1) (Semenza y col, 1994). Recientemente se ha sugerido que la cadena de transporte de

electrones desempeña un rol importante en la detección de la hipoxia (Kwast y col, 1999) Esta conclusión se debe a la observación de que condiciones de hipoxia las células Hep3B inhiben los complejos I y III de la cadena respiratoria mitocondrial, bloquea la unión de HIF1 al ADN mitocondrial y la expresión de los genes regulados por este factor (Chandel y col, 1998)

#### **1.4 Estructura y organización de la Mitocondria**

Las mitocondrias son organelas ovaladas de doble membrana de aproximadamente 2  $\mu\text{m}$  de longitud y 0.5  $\mu\text{m}$  de diámetro. La doble membrana crea dos compartimentos mitocondriales: la matriz o espacio interno y el espacio intermembrana. En estos espacios ocurren los principales procesos que se llevan a cabo en la mitocondria. La mayor parte del ciclo del ácido cítrico y de la oxidación de los ácidos grasos tienen lugar en la matriz mientras que la fosforilación oxidativa ocurre en la membrana interna.

La fosforilación oxidativa es el proceso por el cual se forma ATP como resultado de la transferencia de electrones desde el NADH o el FADH<sub>2</sub> al O<sub>2</sub>, a través de una serie de transportadores de electrones de la cadena respiratoria localizados en la membrana interna mitocondrial. En los organismos aeróbicos este proceso constituye la principal fuente de ATP. Los electrones provenientes de la oxidación de sustratos tales como lípidos y carbohidratos se transfieren a través de 4 grandes complejos proteicos: complejo I NADH deshidrogenasa, complejo II succinato deshidrogenasa, complejo III ubiquinol-citocromo c reductasa y complejo IV citocromo c oxidasa. Este flujo de electrones provoca el bombeo de protones, a través de los complejos I, III y IV, hacia el exterior de la matriz mitocondrial. Este proceso genera un potencial eléctrico transmembrana y un gradiente de pH que impulsa el regreso de los protones a la matriz mitocondrial conduciendo a la síntesis de ATP a través del complejo V ATP sintasa.

##### **1.4.1 ADN mitocondrial**

El genoma mitocondrial difiere del genoma nuclear, entre otros aspectos por el patrón y proceso de evolución. Comparado con el nuclear, el genoma mitocondrial es pequeño ya que cuenta con 16000-18000 pb

representando solo un 0.00055% del primero. A diferencia del genoma nuclear, el mitocondrial es haploide, se hereda por vía materna, no se recombina, carece de intrones y debido a su deficiente sistema de reparación del ADN posee una tasa de mutación alrededor de 10 veces mas alta que la del genoma nuclear (Brown y col. 1979).

El genoma mitocondrial es circular y de doble cadena. Debido a su distinto contenido en GT las dos hebras pueden diferenciarse en un gradiente de densidad como cadena pesada o cadena H y cadena liviana o L. En una célula metabólicamente activa, una alta proporción de moléculas del ADN mitocondrial (ADNmt) contiene una estructura de triple hélice llamada D-loop, en la cual un segmento de la hebra naciente H permanece unida a la hebra parental L (Fernández-Silva y col, 2003)

En los mamíferos, la estructura, el contenido genético y la organización del ADNmt están altamente conservados (Attardi y Schatz, 1988; Pereira,2000).

El ADNmt codifica 37 genes, 24 de los cuales codifican la maquinaria traduccional del propio ADNmt (22 ARN de transferencia -ARNt- y 2 ARN ribosomal -ARNr-) en tanto que los 13 restantes codifican subunidades de proteínas de la cadena transportadora de electrones. Estos incluyen: 7 genes del complejo NADH deshidrogenasa (ND1, ND2, ND3, ND4, ND4L, ND5, y ND6), 3 del complejo citocromo c oxidasa (COI, COII, y COIII), 2 del complejo ATP sintasa (ATP6 y ATP8) y el citocromo b (cit b). Estos genes están asimétricamente distribuidos en el ADNmt. La cadena pesada codifica la mayoría de la información es decir: los dos ARNr, 14 ARNt y los ARN mensajeros (ARNm) de 12 de los 13 polipéptidos. La cadena liviana codifica los 8 ARNt remanentes y el ARNm correspondiente a ND6 (Attardi y Schatz, 1988).

El código genético mitocondrial presenta algunas diferencias con el código genético nuclear. En el código genético mitocondrial UGA no es un codon de terminación sino el que codifica el aminoácido triptofano. Por el contrario, los codones AGA y AGG son codones de terminación en lugar de codones de arginina mientras que AUA que en el código nuclear codifica para isoleucina en el mitocondrial es utilizado para metionina.

Una de las principales características del genoma mitocondrial es su organización génica compacta con todas las secuencias codificantes

contiguas sin intrones o separadas por sólo unas pocas bases (Anderson y col, 1981). Algunos genes como ATP6 y ATP8 y ND4 y ND4L están solapados y otros carecen de codones de terminación completos. Otra característica interesante de la organización de este genoma es que los genes de ARNt están regularmente distribuidos entre los otros genes (Fig.1).

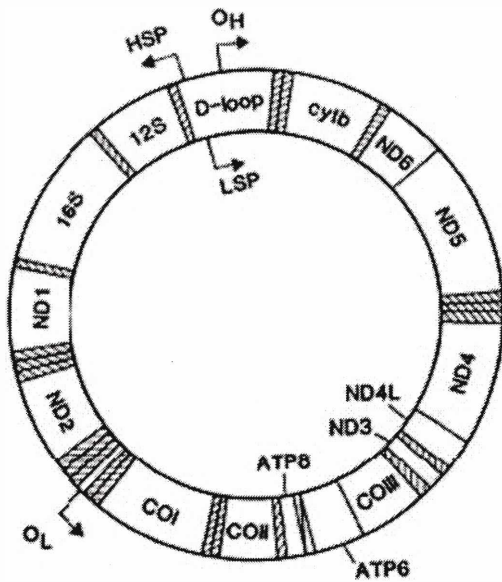



Fig.1 Esquema de la organización del genoma mitocondrial de mamíferos  
 HSP y LSP: promotores de la cadena pesada y liviana respectivamente  
 ARNt

En el ADNmt existen solo dos regiones no codificantes que contienen la mayoría de las funciones regulatorias conocidas. La principal es la región del D-loop o Región Control, situada entre los genes ARNt<sup>Phe</sup> y ARNt<sup>Pro</sup>. Esta región contiene el origen de replicación de la cadena H (O<sub>H</sub>) y los promotores para la transcripción de las cadenas H y L. En diferentes mamíferos la estructura del D-loop también contiene bloques de secuencias conservadas conocidas como CSB, secuencias asociada a la terminación ETAS y estructuras secundarias semejantes a ARNt (tRNA like) (Shadell y Clayton, 1997) que probablemente tienen un rol en la replicación del ADNmt.

La segunda región no codificante, es mucho mas corta (alrededor de 30 nt), contiene el origen de replicación para la cadena L (O<sub>L</sub>) y se ubica



aproximadamente a unos dos tercios de la longitud total del genoma mitocondrial desde  $O_H$ .

#### **1.4.2 Evolución del ADNmt**

Dado que el ADNmt no recombina la causa primaria de evolución es la mutación de los genes. En general un gen o secuencia de ADN mutante puede ser originada por sustitución nucleotídica, inserciones/delecciones (indels), recombinación o conversión génica. Esta mutación puede diseminarse en una población por deriva genética y/o selección natural y finalmente ser fijada en una especie. Las mutaciones deletéreas son seleccionadas en contra y finalmente removidas de la población. Este tipo de selección se llama selección negativa o selección purificadora. Con mucha menor frecuencia, ocurren mutaciones ventajosas que son sujetas a lo que se denomina selección positiva resultando fijadas en la población. También puede ocurrir que una mutación sea completamente neutra en términos de selección natural (Kimura, 1983).

Históricamente los genes mitocondriales fueron tratados como marcadores genéticos neutros, pero trabajos recientes sugieren que los mismos muestran desviaciones de la evolución neutral tal como sería de esperar dado su importante rol en la producción de energía celular (Ballard and Whitlock 2004)

Varios autores han sugerido que los cambios de aminoácidos de los genes mitocondriales, seleccionados positivamente, pueden contribuir al incremento de la capacidad aeróbica (Grossman y col 2004; Dalziel y col, 2006) y a la adaptación a nuevos ambientes térmicos (Ballard y Whitlock 2004, Mishmar y col 2003, Ruiz Pessini y col 2004)

En primates antropoides se han observado tasas aceleradas de evolución en nueve de las 13 subunidades del complejo citocromo oxidasa (Doan y col, 2004) y en dos de las subunidades catalíticas del complejo III (Doan y col 2005). En estas especies también se ha demostrado que COI y COII poseen una tasa de sustituciones no sinónimas superior a la exhibida por primates no antropoides (Andrews y Easteal, 2000; Wu y col, 2000; y Adkins y Honeycutt, 1994). En 2005, Schmidt y col. identificaron 57 residuos de Citocromo oxidasa que probablemente interactúan con Citocromo c, siendo 33 de ellos codificados por el ADNmt. Durante la evolución de los primates

antropoides 7 de estos últimos residuos, han adquirido carga neutra; esta reducción notable de carga se ha observado también en organismos con alta demanda metabólica como las aves. En los primates antropoides este hallazgo se ha atribuido a la emergencia de nuevas características fenotípicas como el aumento del tamaño del cerebro en relación al peso corporal (Martin, 1990) y a la longevidad. El cerebro es un órgano altamente aeróbico por lo que la evolución de estos complejos proteicos de los primates antropoides se puede correlacionar con un aumento en la producción de energía. El complejo III también ha mostrado una rápida evolución en estos primates. Andrews y col (1998) hallaron un aumento en las sustituciones no sinónimas de la subunidad mitocondrial *cytb*. Este complejo es uno de los principales sitios de producción de radicales libres (Guille and Nohl, 2001) por lo que podría haber evolucionado hacia un mejor control de esta reacción secundaria permitiendo así una mayor longevidad (Doan y col, 2005).

Un trabajo reciente (Jobson, 2004), realizado en una planta carnívora del género *Utricularia*, muestra cambios en COI que han sido seleccionados positivamente y podrían estar relacionados a un aumento en la capacidad aeróbica de este linaje. Este trabajo también sugiere que la selección a favor del aumento de la capacidad aeróbica puede influenciar la evolución del ADNmt.

La expansión de poblaciones humanas, desde su origen en África hacia climas más fríos también es un hecho que puede haber influenciado la evolución del ADNmt humano. Recientemente, Mishmar y col (2003) propusieron una asociación entre variantes de proteínas mitocondriales y la adaptación de los ancestros humanos a diferentes regiones del globo. Estos autores encontraron una correlación entre sustituciones de aminoácidos de algunos genes mitocondriales y zonas climáticas. Así, variantes de ATP6 sintasa que reducen la eficiencia de acoplamiento de la fosforilación oxidativa, disminuirían la producción de ATP y aumentarían la generación de calor, lo que sería ventajoso en zonas extremadamente frías.

El conocimiento actual de las estructuras cristalinas de alta resolución de tres de los cinco complejos enzimáticos bovinos de la cadena respiratoria (Abraham y col, 1994; Tzukahara y col 1996; Iwata y col, 1998) provee un contexto estructural en el cual estudiar patrones de restricciones evolutivas

a las que están sujetas estas proteínas. Utilizando esta información para mapear aminoácidos conservados se pueden detectar dominios de las proteínas que son esenciales para la función enzimática y la regulación entre los distintos taxones (Das, 2006) El análisis comparativo de la estructura de COX bovina y datos de secuencias de plantas, de animales y de levaduras mostraron que los sitios conservados caen en tres categorías: -sitios funcionales conocidos conservados en distintas especies, -sitios funcionales conocidos no conservados y -sitios conservados de función desconocida. En la primera categoría, el descubrimiento de algunas funciones conservadas tales como un sitio de interacción de la hormona tiroidea T<sub>2</sub> (conservado en insectos y levaduras), sugiere nuevas hipótesis para estudios experimentales de regulación respiratoria. La segunda categoría de sitios indica cuales regiones pueden ser importantes para la evolución de la especialización fisiológica. La clasificación bioquímica de todos los residuos conservados, incluyendo aquellos de la tercera categoría, y el análisis de su distribución espacial en la estructura cristalina, sugieren que en COX, los clusters de aminoácidos que interactúan son conservados para mantener la base estructural de la evolución de los sitios catalíticos (Das y col, 2004). La extensión de éste tipo de análisis a otros complejos enzimáticos puede aportar nueva información acerca de las restricciones evolutivas y la diversificación funcional en un amplio rango de especies

El descubrimiento de mutaciones en las subunidades, codificadas por el ADN mt de los complejos de la cadena respiratoria, que producen severas deficiencias en el funcionamiento de los mismos y que están asociadas a una amplia variedad de enfermedades degenerativas multisistémicas (Wallace y col 1988, Howell y col, 1991, DiMauro y Schon, 2003) ha generado también un gran interés en la función de las proteínas codificadas por este genoma. En general, las subunidades mitocondriales comprometidas en estas patologías (Mackey y Howell, 1992; Trounce, y col 1994, Rahman y col 1999) forman parte de los centros catalíticos de los complejos respiratorios por lo cual, en muchos de estos casos, la mutación conduce a la sustitución de un residuo clave en la conservación de la estructura y/o función de la enzima (Kervinen, 2006). De esta forma, estos hallazgos han proporcionado a los investigadores información adicional para

correlacionar cambios estructurales y funcionales en esas subunidades. Esto último es especialmente valioso en los complejos mitocondriales como NADH deshidrogenasa, donde su tamaño y la complejidad de su estructura ha dificultado la obtención una estructura de alta resolución (Schafer y col, 2006)

## **2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**

## **2.1 Hipótesis de trabajo**

En Sudamérica, la familia Camelidae tiene dos representantes silvestres que son la vicuña y el guanaco y dos domesticados que son la llama y la alpaca. Cada una de estas especies posee atributos fenotípicos característicos y económicamente atractivos. Por esta razón, el uso comercial de los camélidos en la actualidad ha experimentado un impulso importante como así también la necesidad de un conocimiento acabado de su biología para encarar el mejoramiento genético y aprovechamiento sustentable de estos recursos. Si bien los eventos evolutivos posteriores al origen de los camélidos sudamericanos son poco conocidos, la evidencia de cercanía filogenética reportada por varios autores y la compatibilidad reproductiva que aún existe entre las cuatro formas, permiten inferir una estrecha similitud genético-molecular. Este trabajo de Tesis propone confirmar esta hipótesis y establecer las diferencias evolutivas impresas en el ADN mitocondrial completo del guanaco y la vicuña.

La exposición de los camélidos durante millones de años a las condiciones extremas del altiplano y a la aridez de la Patagonia puede haber influido en la evolución de su ADNmt, seleccionando variantes de las proteínas de la cadena respiratoria que permitan una adaptación más eficiente de estos animales a su hábitat. El guanaco y la vicuña son dos especies de camélidos sudamericanos adaptadas a condiciones extremas de medio ambiente por lo que poseen exigencias metabólicas particulares. En base a esta hipótesis este trabajo de Tesis se propone definir las variantes de aminoácidos potencialmente involucrados en la adaptabilidad de estas especies a su hábitat.

## **2.2 Objetivos generales**

- Contribuir al esclarecimiento de las relaciones filogenéticas de los Camélidos dentro del orden Artiodactyla
- Aportar al conocimiento de mecanismos genéticos de adaptación de los Camélidos sudamericanos a los ambientes fríos e hipóxicos de la Puna andina y a la sequedad y aridez de la Patagonia.

### **2.3 Objetivos específicos**

- Determinar las secuencias de los genomas mitocondriales completos de los camélidos silvestres guanaco y la vicuña
  
- Establecer el grado de diferenciación del ADNmt en estas dos especies
  
- Analizar los genes que codifican proteínas de la cadena respiratoria y comparar las secuencias proteicas inferidas de los camélidos con las de otros cetartiodáctilos que viven a nivel del mar
  
- Establecer, mediante la identificación de cambios propios de camélidos y la información estructural disponible de las proteínas, su posible rol en la adaptación de estos animales al frío, la hipoxia de altura y la aridez del ambiente de la Patagonia.

### **3. MATERIALES Y METODOS**



### **3.1 Muestras**

Para la amplificación del genoma mitocondrial completo se utilizaron muestras disponibles en el Banco de ADN de camélidos del IMBICE. La muestra de guanaco procede de la estancia La Esperanza de Río Negro y la de vicuña de una población de Cieneguillas, Jujuy.

#### **3.1.1 Extracción de ADN total**

A partir de 10 ml de sangre periférica, colectada con anticoagulante ÁCG compuesto de 25mM ácido cítrico, 45mM citrato de sodio, 80mM glucosa, se obtuvo ADN total mediante la técnica de Sambrook y col (1989). La extracción consistió de lisis de las células sanguíneas por incubación con una solución hipertónica de Sacarosa 0,32 M,  $Cl_2$  Mg 5mM, Tris-Cl 10 mM pH 8, y Tritón X 100, lavado del pellet con solución salina e incubación con 100 mg / ml de Proteinasa K en presencia de 1% de SDS durante 3 horas en un baño de  $H_2O$  a 65° C. A continuación se extrajeron proteínas y lípidos mediante 3 extracciones con solventes caotrópicos: a) 1 volumen de fenol saturado pH 7,8, b) 1 volumen de fenol: cloroformo, y c) 1 volumen de cloroformo. Finalmente el ADN se precipitó con alcohol etílico al 100%, se lavó con el mismo alcohol al 70 %, y se resuspendió en una solución de TE (Tris-Cl 10mM, EDTA 1mM, pH 8,5).

### **3.2 Amplificación y Secuenciación del genoma mitocondrial completo**

#### **3.2.1 Diseño de primers**

Los primers para amplificar y secuenciar el genoma mitocondrial completo se diseñaron en base a la secuencia del genoma mitocondrial de la alpaca, disponible en el GenBank (Acceso AJ566364), utilizando el programa Primer 3 (Rozen y col. 2000).

La región comprendida entre las bases 5334 y 15434 correspondientes a la numeración de la secuencia de la alpaca se amplificó en fragmentos solapados de 500-900pb. La Región control se amplificó completa así como también el fragmento restante del genoma, de aproximadamente 6000 pb. La secuenciación se llevó a cabo en fragmentos solapados de tamaño menor a 900 pb. Los primers que no funcionaron fueron rediseñados sobre las secuencias mitocondriales de vicuña y guanaco a medida que se fueron obteniendo. Las secuencias de los primers utilizados se muestran en la Tabla 1

Tabla 1 Primers utilizados en la amplificación y secuenciación del genoma completo

| Fragmento | Longitud | Secuencia Fw              | Secuencia Rv             | T°annealing |
|-----------|----------|---------------------------|--------------------------|-------------|
| MT1       | 553      | GCTCCACTTTCCTTGCTGTC      | TCCTTGTGAGTTCACCTCGT     | 52          |
| MT2       | 623      | GGGCAACCCAAACAAATTAT      | GCTGTTGCTCACTGTATTGGC    | 51          |
| MT3       | 613      | TCATACTAATCCCCCTGACCTGACT | TGCAAGCCGTATAGGGGTAT     | 53          |
| MT4       | 520      | GGCTCCTTAAATTTTCTAAT      | CCAGAATTATTGTTGACTG      | 51          |
| MT5       | 999      | ACTCCCTGAAGCTACATAGG      | GGTCTGAGTGCATATATCAT     | 49          |
| MT6       | 901      | TGACATTGAATCACAATCCA      | TTGTCTTGTAAGACCTCCT      | 51          |
| MT7       | 900      | TTTCTACATATCTGCACCCA      | TGGTTATCATTACTGGATGG     | 51          |
| MT8       | 904      | CTCTATTTCTCTCATTTCTC      | GCGTGTAGATAACGAATAAT     | 49          |
| MT9       | 922      | TGCAAATCATGACAGGACTA      | ATTAGGCTTCGTTGTTGGATGTGT | 53          |
| MT10      | 852      | CTAGGAGACCCCGACAATA       | CGGGTTGATGATTTACAG       | 52          |
| RC        | 932      | AAATATCATTTACCCGCATC      | CTGGCACGAAATTTACCAAC     | 53          |
| MT11      | 822      | GGTTTGATCCAGCCITTCTATTAG  | GGGGCTTTCGTAAGGGTTTT     | 55          |
| MT12      | 856      | CTATAGGGAAACAAAAGTAAGC    | GTCTAAAAGCTGTACCCTT      | 50          |
| MT13      | 900      | TGAGAAGATTTGCAAGTAGA      | TTGATCGGCAGATCTAAATT     | 50          |
| MT14      | 904      | GACGAGAAGACCCTATGGAG      | AGACAGCTAAGCTGGACATA     | 52          |
| MT15      | 905      | CCATCCTAGCTCTAACCCCTA     | GGCCCGATAGCTTATTTAGC     | 52          |
| MT16      | 950      | GAGGTTTAGCCCTCTTATTCTAG   | TGGGTGCAAATCCAGATAGG     | 53          |
| MT17      | 981      | TCACAATAACAATCACAATA      | CGATCATGATTGGTATAACT     | 50          |
| COXIS1    | 872      | GAACCTTGCAATTCATGTGT      | GTGGGAGATTATTCCAAAGC     | 53          |
| COXIS2    | 856      | TCGGCCACCCAGAAGTCTAT      | AAAGTCATAGTGGCTATGGG     | 53          |
| ARNTDS    | 539      | TTGCATCAAACGAGAAGTT       | GGTTATTGATTTTATCCATC     | 50          |
| ATP86     | 1012     | CTGCCTCTATATTATAAGCTCA    | GTCATTAAGGGGCTGAGAG      | 51          |
| COX3      | 942      | TACTTACAATTCTCGAATTTGCCG  | TATCCTTTTTCCGGGTCTCT     | 54          |

### 3.2.2 Amplificación por PCR

Las amplificaciones se realizaron en un volúmen final de 50  $\mu$ l conteniendo alrededor de 30 ng de ADN genómico, 1  $\mu$ M de cada primer, 0,2 mM dNTPs, buffer 1 X PCR (buffer10 X: 50 mM ClK, 10 mM Tris-HCl pH 9,0 y 0,1% Tritón X-100), 2,5 mM  $Cl_2Mg$  y 1.25 U de Taq Polimerasa (INVITROGEN, Argentina).

Las reacciones de amplificación se realizaron en un termociclador (PTC-100, MJ Research) utilizando, para los fragmentos de 500-900pb, un ciclado con las siguientes características: 1 paso a 94° C durante 3 min seguido de 35 ciclos de 1 min a 94° C, 1 min a 49-54° C, dependiendo de los primers y 1 min a 72° C, con una extensión final a 72° C durante 3 min.

En el caso de la amplificación de fragmentos de tamaño superior a 2Kb se utilizó el Kit comercial LA PCR (Long and Accurate polymerase chain reaction kit, Takara, Osaka, Japan) que permite la amplificación precisa de fragmentos de hasta 40 Kb. Las condiciones de ciclado fueron: una desnaturalización inicial de 40 segundos a 95°C, 30 ciclos de 40 seg a 94°C, 1 min a 54 °c y un paso

de extensión a 68°C de 1 min por cada Kb de tamaño del fragmento a amplificar.

### **3.2.3 Electroforesis en geles de agarosa**

La amplificación de fragmentos del tamaño esperado se comprobó mediante electroforesis en geles de agarosa al 1,5%, teñidos con Bromuro de Etidio 0,5 mg/ml y posterior visualización con luz UV. El peso molecular se controló mediante la utilización de los marcadores pGem y Lambda / HindIII (Promega).

### **3.2.4 Secuenciación**

Los productos de amplificación del tamaño esperado se purificaron mediante columnas con membrana de sílica en presencia de sales caotrópicas (Qiaquick, de QiaGen) o bien por precipitación con polietilenglicol (PEG). El material purificado se secuenció en forma automática en ambas direcciones con los primers Fw y Rv utilizados en la amplificación.

## **3.3 Análisis de las secuencias obtenidas**

### **3.3.1 Determinación de la organización y características generales del genoma mitocondrial del guanaco y la vicuña**

La identidad de las secuencias obtenidas se confirmó utilizando el programa nucleotide BLAST ([www.ncbi.nih.gov](http://www.ncbi.nih.gov)) que permite encontrar similitudes entre la secuencia de interés en estudio y otras depositadas en una gran base de datos como por ejemplo el GenBank. Los distintos fragmentos del genoma mitocondrial completo se ensamblaron en forma manual. La organización del genoma mitocondrial así como los codones de inicio y terminación de las regiones codificantes y de las secuencias de los ARN ribosómicos se determinaron mediante la comparación de sus respectivas secuencias con las secuencias publicadas de los cetartiodáctilos vaca, cerdo, ballena, oveja y alpaca. La secuencia y ubicación de los genes de ARN de transferencia (ARNt) se definió con el programa tRNAscan-SE1.2 (Lowe y Eddy, 1997). Los motivos repetidos de la Región Control se identificaron con el programa Tandem Repeats Finder v. 4.00 (<http://tandem.bu.edu/trf/trf.html>)

### **3.3.2 Comparación de los genomas del guanaco y la vicuña**

Los genomas de ambos animales se alinearon y compararon utilizando los programas CLUSTAL V (Higgins y *col.* 1998) y GeneDoc v 2.6.002 (Nicholas y *col.* 1997). La composición de bases y el número de diferencias entre ellos se

calculó en base a la secuencia de nucleótidos y de aminoácidos deducida, con el programa MEGA3.1 (Kumar 2004). La secuencia de aminoácidos se obtuvo a partir de la secuencia de nucleótidos utilizando, para su traducción, el código genético mitocondrial.

**Distancia p (nucleótidos)**

Esta distancia representa la proporción (p) de sitios nucleotídicos en los cuales difieren dos secuencias que están siendo comparadas y es una medida simple del grado de divergencia entre las mismas. Se obtiene dividiendo el número total de diferencias en nucleótidos por el total de sitios comparados. (Nei y Kumar, 2000).

La proporción de diferencias nucleotídicas entre los distintos genes del guanaco y la vicuña, expresada en porcentaje, se calculó mediante la siguiente fórmula:

$$P = \frac{n \times 100}{L}$$

P: proporción de diferencias nucleotídicas expresado en porcentaje

n: número de sitios diferentes entre las secuencias comparadas

L: longitud de la secuencia de nucleótidos

La proporción de aminoácidos diferentes puede ser calculada de la misma forma. En ese caso, n es el número de aminoácidos diferentes y L la longitud de la proteína.

En ambos casos los indels o gaps no se incorporaron en el cálculo.

**Cálculo del número de transiciones y transversiones**

Las sustituciones se pueden dividir en transiciones y transversiones. Las transiciones son cambios entre A y G (purinas) o entre C y T (pirimidinas). Las transversiones son cambios entre una purina y una pirimidina. Por lo tanto, existen cuatro tipos de transiciones A→G, G→A, C→T y T→C y ocho tipos de transversiones, A→C A→T C→A, C→G T→A, T→C G→C, G→T.

Las mutaciones que ocurren en regiones codificantes de proteínas, si no cambian el aminoácido que codifican, se denominan sinónimas; en caso contrario, reciben el nombre de no sinónimas. Debido a la estructura del código genético los cambios sinónimos ocurren principalmente en la tercera posición de los codones. Contrariamente, todos los cambios nucleotídicos en la segunda

posición son no sinónimos al igual que la mayoría de los cambios en la primera (96%)

El cálculo del número de transiciones y transversiones, para cada posición en los codones, se realizó utilizando el programa MEGA3.0

### **Estimación del tiempo de divergencia**

En el orden Artiodactyla la acumulación de sustituciones en los genes ribosomales 16S y 12S ha sido ampliamente estudiada (Miyamoto y Boyle (1989), Miyamoto y col (1990); Kraus y Miyamoto (1991). El tiempo de divergencia de las especies guanaco y vicuña se estimó utilizando el valor de 0.8% por millón de años calculado por Miyamoto y Boyle (1989) para la acumulación de transiciones en estos genes durante los primeros 7 años de evolución separada. Esta tasa se aplicó al valor medio de las diferencias transicionales obtenido para los genes 16Sr y 12Sr utilizando la siguiente fórmula

$$T \approx \frac{0.8\%}{t_s}$$

T: tiempo de divergencia

$t_s$ : diferencias transicionales expresadas en porcentaje

### **3.3.3 Análisis de las proteínas de la cadena respiratoria**

Con el fin de identificar características y sustituciones de aminoácidos propias y o exclusivas de los camélidos, las secuencias de las 13 proteínas de la cadena respiratoria del guanaco y de la vicuña se alinearon y compararon con las de los camellos del Viejo Mundo dromedario (GenBank [EF212038](#)) y bactriano ([EF212038](#)) y con las de los cetartiodáctilos vaca (*Bos taurus*, [J01394](#)), cerdo (*Sus scrofa*, [AF034253](#)), oveja (*Ovis aries* [NC001941](#)) y ballena azul (*Balaenoptera musculus*, [X72204](#)) que habitan distintos habitats, utilizando los programas CLUSTAL W y Mega3.0. Definimos como sustituciones propias a aquéllas que ocurren en un sitio de las secuencias del guanaco y la vicuña que en los demás cetartiodáctilos comparados es totalmente conservado.

Para designar los aminoácidos se utilizó el código de una letra (Ver Material suplementario, Anexo II)

En los casos que se hallaron sustituciones propias de los camélidos, se incrementó el número de animales en el alineamiento para confirmar el

grado de conservación de esos sitios en otros mamíferos representantes distintos órdenes. Para ello se utilizaron las secuencias de la foca de puerto (*Phoca vitulina*, Carnívora, X63726 ), del caballo (*Equus caballus*, *Perissodactyla*, AY584828), del chimpancé pigmeo (*Pan paniscus*, *Primates*, NC 001644 y del humano (*Homo sapiens*, *Primates*, AY738947) y de la rata (*Rattus norvegicus*, *Rodentia*, AC 000022).

Para el análisis de las subunidades ATP6 y ATP8, se agregaron además las secuencias de la cabra (*Capra Hircus*, *Cetartiodactyla*, NC 005044), del venado muntjak (*Muntiacus muntjak*, *Cetartiodactyla*, AY225986), del antílope tibetano, (*Pantholops hodgsonii*, *Cetartiodactyla*, DQ191826), del oso (*Ursus Arctos*, *Carnivora* NC 003427), de la ballena blanca (*Balaenoptera physalus*, *Cetartiodactyla*, X61145), y del orangután de Borneo (*Pongo Pygmaeus*, *Primates*, NP 008230).

La naturaleza de las sustituciones de aminoácidos se evaluó de acuerdo a la clasificación descrita en Rand y col (2000).

Por polaridad:                    -Polar (R,N,D,C,Q,E,G,H,K,S,T,Y)  
  -No polar (A,I,L,M,F,P,W,V)

Por polaridad y volumen: -Especial (C)  
  -Neutro y pequeño (A, G, P, S, T)  
  -Polar y relativamente pequeño (N,D,Q,E)  
  -Polar y relativamente grande (R,H,K)  
  -No polar y relativamente pequeño (I, L, M, V)  
  -No polar y relativamente grande (F, W, Y)

Por carga (Zhang, 2000): -Positivo (R, H, K)  
  -Neutro (A, N, C, Q, G, I, L, M, F, P, S, T, W, Y, V)  
  -Negativo (D, E)

Para cualquiera de las tres clasificaciones, los cambios de aminoácidos que involucran residuos dentro de una misma categoría son definidos como conservativos mientras que los que involucran aminoácidos de categorías diferentes son definidos como no conservativos o radicales.

### 3.3.4 Modelado de la subunidad II del complejo citocromo oxidasa (COII)

El modelado de COII de las proteínas deducidas en camélidos se realizó utilizando el programa SCWRL (Canutescu y col, 2003) y el complejo citocromo oxidasa bovino como template (*PDB code locz*).

### 3.4 Prueba de Tasas relativas de evolución de las proteínas

Con el propósito de evaluar las similitudes o diferencias entre las tasas relativas de evolución de las proteínas de los camélidos sudamericanos y las de otros cetartiodáctilos, se compararon las tasas de reemplazos de aminoácidos con las de dromedario, bactriano, vaca, ballena, cerdo y oveja utilizando el test de Tajima (Tajima, 1993), incluido dentro del programa MEGA3.0. El perisodáctilo *Equus caballus* fue utilizado como outgroup. La hipótesis de reloj molecular evolutivo, asume que las tasas de sustitución de nucleótidos y aminoácidos son aproximadamente constantes en el tiempo. El test de Tajima permite probar, de una manera muy simple y sin necesidad de asumir un patrón particular de tasas de sustitución, esta hipótesis.

Este es un test no paramétrico, que para su aplicación no requiere el conocimiento del tiempo de divergencia entre especies

Consideremos tres secuencias, 1, 2 y 3, y consideremos a esta última como grupo externo (outgroup). Sea  $n_{ijk}$  el número de sitios observados en los cuales las secuencias 1, 2 y 3 tienen los aminoácidos  $i$ ,  $j$  y  $k$ .

Bajo la hipótesis de reloj molecular,  $E(n_{ijk}) = E(n_{jik})$  independientemente del modelo de sustitución y de cómo las tasas de sustitución varían o no con el sitio. Si esta hipótesis es rechazada, entonces la hipótesis de reloj molecular también puede ser rechazada para ese grupo de secuencias.

Definamos  $m_1$  y  $m_2$  como

$$m_1 = \sum n_{ijj} \quad \text{y} \quad m_2 = \sum n_{jjj}$$

De ese modo, solo los sitios en los cuales existen exactamente dos tipos de aminoácidos en las tres secuencias son utilizados en el análisis.

Cuando la secuencia 3 es el outgroup, la esperanza de  $m_1$  es igual a la de  $m_2$  bajo la hipótesis de reloj molecular:

$$E(m_1) = E(m_2)$$

La igualdad puede ser probada utilizando el siguiente estadístico  $X^2$ , con un grado de libertad:

$$X^2 = \frac{(m_1 - m_2)^2}{m_1 + m_2}$$

### 3.5 Tasas relativas de sustitución sinónima y no sinónima

Las diferencias entre las tasas relativas de sustitución del gen COXII del guanaco y la vicuña y los demás cetartiodáctilos analizados en este trabajo, se estimaron mediante el programa RRTree (Robinson-Echave y Huchon, 2000) utilizando el caballo como outgroup. Este programa permite estimar las tasas relativas de sustitución sinónima ( $K_s$ ) y no sinónima ( $K_a$ ) entre distintos linajes con respecto a un outgroup utilizando el método de Li (1993) y Pamilo y Bianchi (1993)

### 3.6 Selección positiva

La presión selectiva, a nivel de las proteínas, puede ser medida como el cociente ( $\omega$ ) entre las tasas de sustitución no sinónima ( $K_a$ ) y sinónima ( $K_s$ ). Si las mutaciones no sinónimas son favorecidas por selección positiva, se fijarán a una tasa mayor que las sinónimas,  $\omega > 1$ . Si por el contrario resultaran deletéreas, se fijarán a una tasa menor que las sinónimas, resultando  $\omega < 1$  (selección purificadora). De esta forma, valores de  $\omega$  mayores a 1 son un buen indicio de selección positiva.

Utilizando el programa Codeml del paquete PAML3.15 (Yang, 1997) se estimaron los ratios  $\omega$  a lo largo de los linajes basándose en las relaciones entre los Artiodáctilos que se muestran en la Figura 2

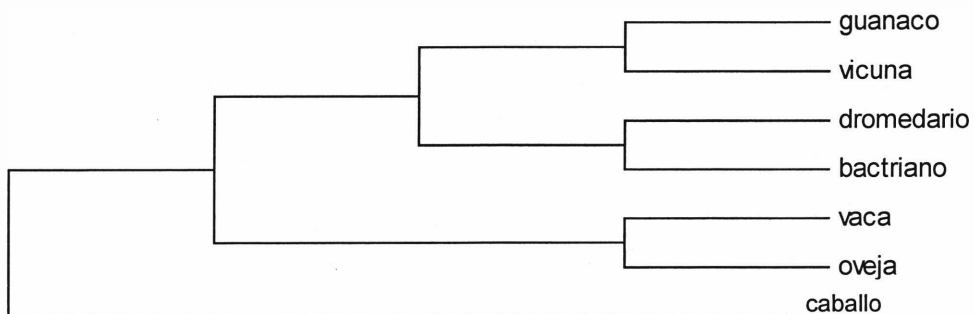


Figura 2 Esquema de relaciones entre especies de Artiodáctilos



Se emplearon dos modelos: 1) de radio libre, que permite variar  $\omega$  ( $K_a/ K_s$ ) a lo largo de cada rama y 2) de rama-sitio, que permite variar  $\omega$  entre sitios y entre ramas.

**4.**

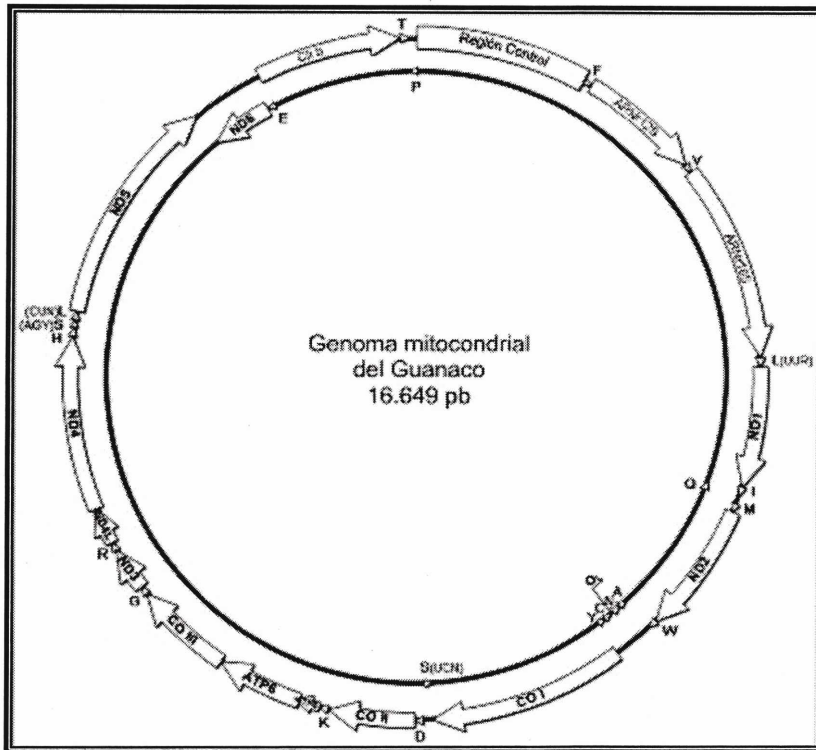
## **RESULTADOS**

## **4.1 Secuencia de los genomas mitocondriales del guanaco y de la vicuña**

Durante este trabajo de Tesis se determinó la secuencia completa del genoma mitocondrial del guanaco y de la región codificante del genoma mitocondrial de la vicuña. A continuación se describen las características generales del ADNmt de estas dos especies, seguidas de la comparación de sus regiones codificantes.

### **4.1.2 Organización y características generales del genoma mitocondrial de camélidos**

El genoma mitocondrial del guanaco (Fig3) abarca 16649 pares de bases y la composición de la cadena L es T: 27.4% C: 26.2 A:31.7 G:14.6. El análisis de esta molécula identificó 13 genes codificantes de proteínas, 22 ARNs de transferencia, 2 ARNs ribosomales, y una Región de control (RC) similar a la descrita para el camélido alpaca de referencia (Arnason y col, 2004) y otros mamíferos euterios (Arnason y Gulberg, 1993; Xu y col 1996; Hiendleder y col 1998, Ursing y Arnason,1998). En la vicuña el genoma mitocondrial obtenido totaliza 16083 bases, es decir, 567 bases menos que en el guanaco. Las bases faltantes corresponden al extremo 3' de la Región de control. Este segmento no pudo determinarse con exactitud debido a que coamplificaron dos fragmentos de tamaño similar con secuencias altamente homólogas entre sí y con la RC de guanaco y de la alpaca. Las 16083 bases del genoma mitocondrial determinadas en vicuña difieren en un 4,6 % de la secuencia correspondiente al guanaco. Las secuencias de los genomas mitocondriales del guanaco y la vicuña se muestran en el Anexo I del Material suplementario.



**Figura 3.** Organización del genoma mitocondrial del guanaco. El círculo externo representa la cadena H y el interno la cadena L.

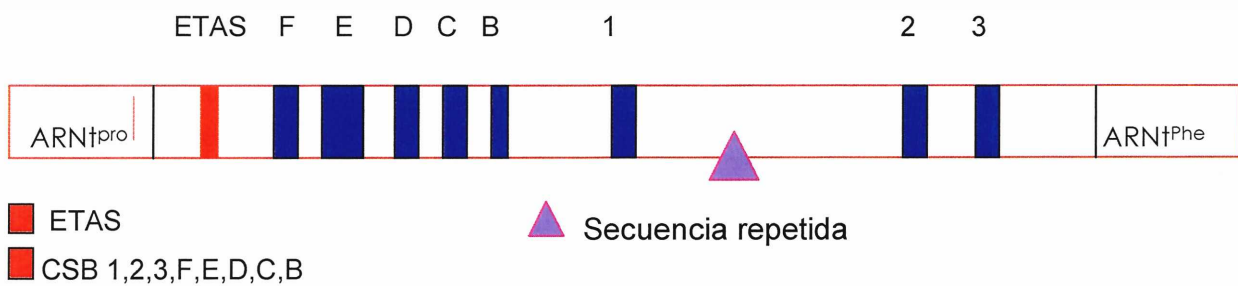
#### 4.1.2.1 Regiones no codificantes

##### **Región Control**

La región control del ADNmt del guanaco tiene una longitud de 1215 pb. Entre las bases 682 y 892 presenta un motivo repetido imperfecto de 30 pb que se repite 7 veces. A continuación se ilustran las dos unidades de repetición halladas.

- 1- CACGTACACGTACGCATACACACCCACACC
- 2- CACGTACACGTACGCATACACACCCACGTA

Una de las principales características de la Región de control es su alta variabilidad, incluso entre especies muy cercanas. No obstante, los elementos de secuencia, vinculados a funciones regulatorias, son altamente conservados. La organización de la RC mitocondrial del guanaco (Fig.4) comprende los ocho bloques de secuencia conservada (CSB 1, 2, 3 y CSB B, C, D, E, F) y una secuencia extendida asociada a la terminación (ETAS) que han sido descritos en otros mamíferos (Walberg y Clayton, 1981; Southern y col, 1988) Esta región es idéntica a la de alpaca publicada (Arnason y col, 2004) mientras que presenta una única sustitución con respecto al bactriano y dromedario.



**Figura 4.** Organización de la región control del guanaco

Los CSB 2, C, D y F son idénticos a los publicados para el dromedario y el bactriano y difieren de la alpaca en una base. El resto de los CSB se diferencian de los otros camélidos por una única sustitución. Entre los CSB 1 y 2 se encuentra el motivo de 30 de bases repetido 7 veces.

El fragmento que se obtuvo de la RC de la vicuña corresponde a la región 5' y contiene el dominio ETAS además de todos los bloques de secuencia conservada excepto los CSB 2 y 3 que se localizan en el extremo que no fue posible secuenciar.

#### ***Origen de replicación de la cadena L***

El origen de replicación de la cadena L (Ori L) del ADNmt del guanaco y la vicuña tiene 33 pb de extensión y se localiza dentro del cluster de genes que codifican los aminoácidos WANCY (Trp, Ala, Asn, Cys, Tyr) entre los genes ARNtAsp y ARNtCys. Los extremos de esta secuencia son autocomplementarios, lo que les permite adoptar una estructura secundaria en forma de horquilla. La secuencia de bases del tallo (stem) compuesto por 11 nucleótidos, muestra complementariedad intracadena completa. Las diferencias con respecto a las secuencias de los cetartiodáctilos de referencia vaca, cerdo, oveja y ballena, se localizan en el bucle (loop) formado por 14 nt, es decir, un nucleótido más extenso que en estos últimos animales. También en esa región, el guanaco y la vicuña poseen 2 sustituciones respecto de ballena y vaca, y tres respecto de cerdo y oveja.

#### 4.1.2.2 Región codificante

La Tabla 2 muestra la localización y otras características de los genes mitocondriales del guanaco y la vicuña. El sitio 1 se corresponde con la misma posición de la secuencia de referencia de alpaca (AJ566364)

Tabla 2 Localización y características de los genes mitocondriales en el guanaco y la vicuña

| Gen                         | Desde      | Hasta       | Codon de inicio | Codon de stop |
|-----------------------------|------------|-------------|-----------------|---------------|
| ARNt Phe                    | 1          | 67          | nc              | nc            |
| ARNr12S                     | 68         | 1034 (1035) | nc              | nc            |
| ARNt Val                    | 1035(1036) | 1105(1106)  | nc              | nc            |
| ARNr16s                     | 1106(1107) | 2667        | nc              | nc            |
| ARNtLeu(UUR)                | 2668       | 2742        | nc              | nc            |
| ND1                         | 2746       | 3701        | ATG             | TAA           |
| ARNtIle                     | 3702       | 3770        | nc              | nc            |
| ARNtGln (L)                 | 3768       | 3840        | nc              | nc            |
| ARNtMet                     | 3842       | 3910        | nc              | nc            |
| ND2                         | 3911       | 4952        | ATA             | Taa           |
| ARNtTrp                     | 4953       | 5019        | nc              | nc            |
| ARNtAla(L)                  | 5025       | 5093        | nc              | nc            |
| ARNtAsn(L)                  | 5095       | 5167        | nc              | nc            |
| Origen replicac<br>cadena L | 5168       | 5200        | nc              | nc            |
| ARNtCys(L)                  | 5201       | 5267        | nc              | nc            |
| ARNtTyr(L)                  | 5268       | 5334        | nc              | nc            |
| COI                         | 5336       | 6880        | ATG             | TAG           |
| ARNt ser(UCN)               | 6882       | 6950        | nc              | nc            |
| ARNtAsp                     | 6957       | 7023        | nc              | nc            |
| COII                        | 7024       | 7707        | ATG             | TAA           |
| ARNtLys                     | 7711       | 7777        | nc              | nc            |
| ATP8                        | 7779       | 7982        | ATG             | TAA           |
| ATP6                        | 7940       | 8620        | ATG             | TAA o TAA     |
| COIII                       | 8620       | 9402        | ATG             | Taa           |
| ARNtGly                     | 9403       | 9472        | nc              | Nc            |
| ND3                         | 9473       | 9819        | ATA o ATC       | Taa oTAA      |
| ARNtArg                     | 9820       | 9887        | nc              | Nc            |
| ND4L                        | 9888       | 10184       | ATG             | TAA           |
| ND4                         | 10178      | 11555       | ATG             | TA            |
| ARNtHis                     | 11556      | 11624       | nc              | Nc            |
| ARNtSer(AGY)                | 11625      | 11683       | nc              | Nc            |
| ARNtLeu(CUN)                | 11685      | 11754       | nc              | Nc            |
| ND5                         | 11755      | 13575       | ATA             | TAA           |
| ND6(L)                      | 13559      | 14086       | ATG             | TAA           |
| ARNtGlu(L)                  | 14088      | 14156       | nc              | Nc            |
| Cytb                        | 14161      | 15300       | ATG             | AGA           |
| ARNtThr                     | 15301      | 15369       | nc              | Nc            |
| ARNtPro                     | 15369      | 15434       | nc              | nc            |
| Región Control              | 15435      | 16649 (nd)  | nc              | nc            |

Entre parentesis, posición de los genes en la vicuña

nc: no codifica proteína

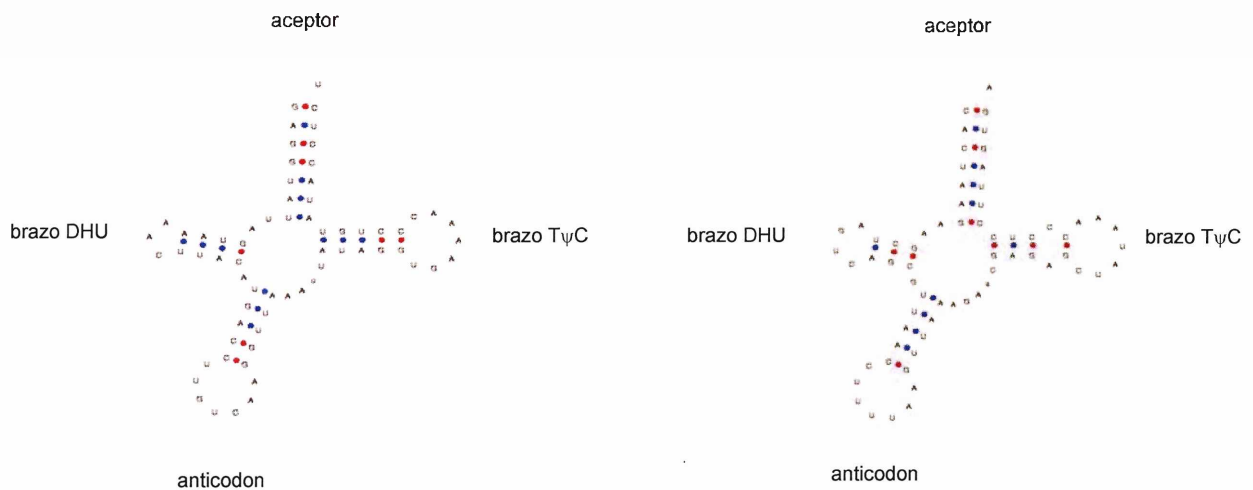
nd: no determinado

#### Genes de ARN de transferencia

En el ADN mitocondrial del guanaco y de la vicuña se identificaron 22 ARN de transferencia los cuales poseen anticodones coincidentes con el código genético mitocondrial y además, 21 de ellos son capaces de plegarse y conformar una estructura en hoja de trébol. El ARNt Ser carece de elementos de secuencia tales

como el anticodon y los dos brazos necesarios para formar esta estructura. Los ARNt<sup>Val</sup> y ARNt<sup>Met</sup> contienen, en el brazo del aceptor, un par de bases no clásico A-G. El ARNt<sup>Met</sup> también contiene UU en el brazo T $\psi$ C, en tanto que el ARNt<sup>Lys</sup> presenta, en la misma región, un par AC. Otro apareamiento no habitual CU se observa en el brazo del aceptor del ARNt<sup>Thr</sup>

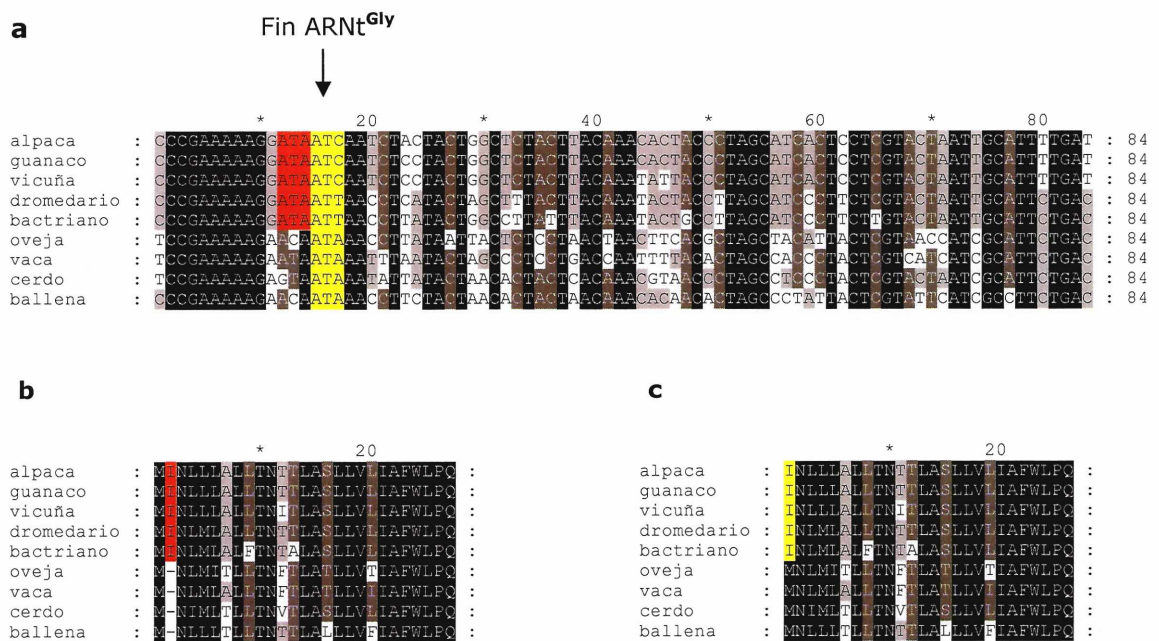
La Figura 5 ilustra el plegamiento de la estructura del ARNt<sup>Asp</sup> y el ARNt<sup>Lys</sup>



**Figura 5** Estructura secundaria de los ARNt<sup>Asp</sup> y el ARNt<sup>Lys</sup>

### **Genes codificantes de proteínas**

El análisis de los ADNmt de ambos camélidos identificó los 13 genes codificantes de las proteínas mitocondriales descritos en todos los mamíferos investigados hasta el presente. Los genes ND1, ND4, ND4L, ND6, Cytb, COI, COII, COIII, ATP6 y ATP8 tienen un codón de inicio ATG; ND2 y ND5 comienzan con ATA en tanto que ND3 presenta dos orígenes posibles aptos para la traducción: un codón ATA frecuentemente descrito para esta proteína en diversos mamíferos y el codón contiguo ATC que aunque menos frecuente ha sido también observado en genes mitocondriales de varias especies (Fig. 6a). El inicio de la traducción en el codón ATA codifica en guanaco y vicuña una proteína con una inserción I en la posición 2 de la secuencia con respecto a otros animales. (Fig. 6b)



**Figura 6 a** Alineación entre camélidos y otros cetartiodáctilos de la región correspondiente al extremo 3´ del ARNt<sup>Gly</sup> y el inicio del gen ND3 resaltando los dos posibles codones de inicio (ATA y ATC)

**b y c** Productos de traducción del extremo 5´ de ND3 utilizando los codones de inicio ATA y ATC respectivamente

Los genes COII, ATP8, ND4L, ND5 y ND6 presentan, en todos los casos, codones de terminación completos TAA; por el contrario, COI termina en TAG y cit b en AGA. Si bien en CO I, el codon de stop TAG no es muy frecuente también se lo ha observado en la terminación de ND1 de cerdo y en la de COIII de ballena. El resto de los genes mitocondriales de guanaco y vicuña poseen codones de terminación incompletos TA o T. Para estos casos se ha sugerido que los transcriptos de esos genes tienen un codon de terminación que se completa mediante poliadenilación post-transcripcional (Ojala, y col 1981). En el caso de ATP6 y ND3 el codon de stop puede ser TAA o TAA. En este último caso, la segunda A es también el codon de iniciación de COIII.

Otra característica de los genes mitocondriales de los camélidos, compartida con otros mamíferos, es el solapamiento de 43 bases en los genes ATP6 y ATP8. Solapamientos menores, de 7 bases también se observan entre los genes ND4L y ND4 y de 12 bases entre ND5 y ND6 .



## 4.2 Comparación de los genomas mitocondriales del guanaco y la vicuña

### Genes codificantes de proteínas

Las diferencias nucleotídicas entre los ADNs mitocondriales de ambas especies se evaluaron de acuerdo al tipo de sustitución (transición o transversion) y a la posición donde ocurren (Tabla 3)

Los 13 genes codificantes de proteínas presentan un total de 589 diferencias, lo cual representa una diferencia intergenómica del 5,2 %. Del total de sustituciones 550 son transiciones y 39 transversiones. La proporción de las sustituciones totales respecto de su posición en los codones es 7,7:1: 56,8 siendo estos valores superiores a los radios obtenidos por (Arnason y col 1993) en la comparación intragenérica entre la foca gris (*Halychocerus gripus*) y la foca de puerto (*Phoca vitulina*). El bajo número de transversiones en la segunda posición en el caso de guanaco y vicuña probablemente explique estas diferencias.

**Tabla 3** Distribución de diferencias nucleotídicas, en los genes de la cadena respiratoria, con respecto a su posición en los codones

| Gen   | Longitud pb) | Totales |    | Posición 1 |    | Posición 2 |    | Posición 3 |    |
|-------|--------------|---------|----|------------|----|------------|----|------------|----|
|       |              | Ti      | Tv | Ti         | Tv | Ti         | Tv | Ti         | Tv |
| ND1   | 956          | 52      | 6  | 3          | -  | -          | -  | 49         | 6  |
| ND2   | 1042         | 50      | 4  | 10         | 1  | 1          | -  | 39         | 3  |
| COI   | 1545         | 66      | 2  | 5          | -  | -          | -  | 61         | 2  |
| COII  | 684          | 29      | 3  | 3          | -  | -          | -  | 26         | 3  |
| ATP8  | 204          | 6       | 1  | -          | -  | -          | -  | 6          | 1  |
| ATP6  | 681          | 13      | -  | 3          | -  | -          | -  | 10         | -  |
| COIII | 784          | 31      | 2  | 3          | -  | -          | -  | 28         | 2  |
| ND3   | 350          | 20      | -  | 3          | -  | 2          | -  | 15         | -  |
| ND4L  | 297          | 11      | -  | -          | -  | -          | -  | 11         | -  |
| ND4   | 1377         | 70      | 4  | 8          | -  | -          | -  | 62         | 4  |
| ND5   | 1821         | 103     | 12 | 13         | 3  | 2          | 1  | 88         | 8  |
| ND6   | 528          | 30      | 1  | 4          | -  | 1          | -  | 25         | 1  |
| CYTB  | 1140         | 69      | 4  | 10         | -  | 2          | -  | 57         | 4  |
| total | 11409        | 550     | 39 | 65         | 4  | 8          | 1  | 477        | 34 |

Ti= número de transiciones; Tv= número de transversiones

La Tabla 4 muestra las diferencias totales de nucleótidos (nt) y aminoácidos (aa) entre los 13 genes codificantes proteínas.

**Tabla 4** Diferencias de nucleótidos y aminoácidos de los genes mitocondriales codificantes de proteínas del guanaco y la vicuña

| Gen   | Dif. de nt | Dif de aa | Nº tot de aa |
|-------|------------|-----------|--------------|
| ATP6  | 13 (1.9)   | 1 (0.4)   | 226          |
| ATP8  | 7 (3.4)    | 1 (1.5)   | 67           |
| ND4L  | 11 (3.7)   | 0(0.0)    | 98           |
| COIII | 33 (4.2)   | 0 (0.0)   | 261          |
| COI   | 68(4.4)    | 0(0.0)    | 514          |
| COII  | 32 (4.7)   | 0(0.0)    | 227          |
| ND2   | 54(5.2)    | 7(2)      | 347          |
| ND4   | 74 (5.4)   | 2 (0.4)   | 459          |
| ND3   | 20 (5.7)   | 3 (2.6)   | 116          |
| ND6   | 31 (5.9)   | 5(2.9)    | 175          |
| ND1   | 58(6.1)    | 0(0.0)    | 318          |
| ND5   | 113 (6.2)  | 10 (1.6)  | 606          |
| Cytb  | 73(6.4)    | 6 (1.6)   | 379          |
| Total | 550        | 35 (0.9)  | 3793         |

nt= nucleótidos; aa=aminoácidos. Entre paréntesis diferencias expresadas en porcentaje

Las diferencias de nucleótidos entre las dos especies varió desde 1.9% en ATP6 a 6.4% en Cit b. El orden creciente de diferencias nucleotídicas que se observa en la Tabla 3 no se corresponde con las diferencias de aminoácidos. El gen ND1 aún cuando se ubica entre los genes más variables codifica una secuencia de aminoácidos idéntica en guanaco y vicuña. Lo mismo ocurre con ND5 y Cit b, que si bien son los genes con mayores diferencias nucleotídicas, las secuencias de sus aminoácidos sólo difieren en 1.6 % de los sitios.

Las sustituciones de aminoácidos mas frecuentes entre guanaco y vicuña fueron I por V, seguida de T por I y A por T. Solamente se observaron dos sustituciones, K por N y H por Y que implican el reemplazo de un aminoácido neutro por uno cargado.

### **ARN de transferencia**

Los resultados de la comparación entre los 22 ARN de transferencia del guanaco y la vicuña indican que la longitud de cada gen es similar en ambas especies y la secuencia es idéntica en 6 de ellos. Las diferencias se deben mayormente a transiciones con una única transversión en el ARNt<sup>Glu</sup> y ningún in/del. El mayor número de diferencias se observó en el gen ARNt Asp con 5 transiciones (Tabla 5).

**Tabla 5** Longitud y diferencias nucleotídicas entre los ARNt mitocondriales del guanaco y la vicuña

| Gen           | Longitud | Diferencias nucleotídicas |
|---------------|----------|---------------------------|
| ARNt-Phe      | 67       | 2                         |
| ARNtVal       | 71       | 1                         |
| ARNtLeu (UUR) | 75       | 2                         |
| ARNtIle       | 69       | 0                         |
| ARNtGln       | 73       | 2                         |
| ARNtMet       | 69       | 2                         |
| ARNtTrp       | 67       | 1                         |
| ARNtAla       | 69       | 2                         |
| ARNtAsn       | 73       | 0                         |
| ARNtCys       | 67       | 0                         |
| ARNtTyr       | 67       | 2                         |
| ARNtSer (UCN) | 69       | 0                         |
| ARNtAsp       | 67       | 5                         |
| ARNtLys       | 67       | 2                         |
| ARNtGly       | 69       | 3                         |
| ARNtArg       | 68       | 2                         |
| ARNtHis       | 69       | 3                         |
| ARNtSer       | 59       | 0                         |
| ARNtLeu       | 70       | 0                         |
| ARNtGlu       | 69       | 2 (1)                     |
| ARNtThr       | 69       | 1                         |
| ARNtPro       | 66       | 2                         |
| Total         | 1511     | 33(1)                     |

Entre paréntesis el número de transversiones

### **ARN ribosómicos 12S y 16S**

Los genes ribosómicos 12S (ARNr 12S) y 16S (ARNr16S) fueron los únicos genes mitocondriales que mostraron diferencias de longitud entre el guanaco y la vicuña. Esta diferencia se debe a la presencia en ambos genes de un indel que da como resultados un ARNr 12S de 967 y 968 pb y un 16S de 1562 y 1561 pb en guanaco y vicuña, respectivamente. La Tabla 6 detalla estas diferencias.

**Tabla 6** Diferencias entre los genes ribosómicos 12S y 16S del guanaco y la vicuña

|         | Longitud (nt)<br>(gua / vic) | Diferencias nucleotídicas | Nro.de transiciones | Nro. de tranversiones | Nro de indels |
|---------|------------------------------|---------------------------|---------------------|-----------------------|---------------|
| ARNr12S | 967 / 968                    | 21 (2.2)                  | 19 (2)              | 1                     | 1             |
| ARNr16S | 1562/1561                    | 32 (2)                    | 29 (1.8)            | 2                     | 1             |
| Total   | 2529/2529                    | 53 (2.1)                  | 48 (1.9)            | 3                     | 2             |

Gua= guanaco; vic= vicuña. Entre paréntesis diferencias nucleotídicas expresadas en porcentaje

La acumulación de transiciones en estos genes ha sido calculada en aproximadamente 0.8% por millón de años (Miyamoto y Boyle, 1989). Aplicando

este valor al 1.9% de diferencias transicionales observadas entre los ARNr del guanaco y la vicuña, la separación entre estas especies se ubicaría hace aproximadamente, 2.4 millones de años

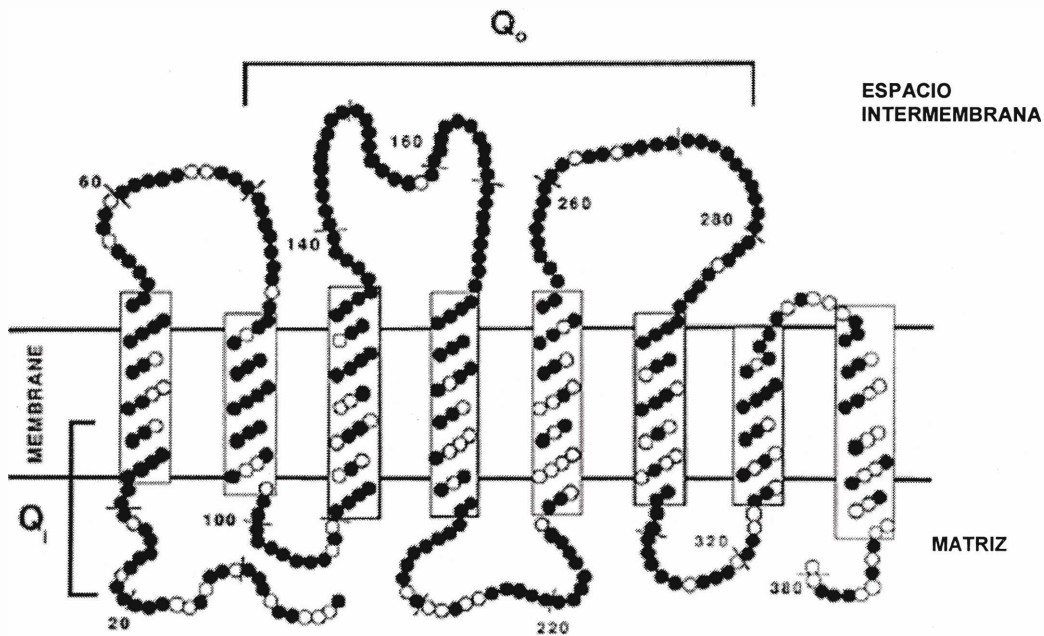
### **4.3 Características de las proteínas de la cadena respiratoria en camélidos**

Las secuencias de las proteínas de la cadena respiratoria mitocondrial de la vicuña y el guanaco, deducidas a partir de la secuencia de nucleótidos determinados experimentalmente, se alinearon con las de los cetartiodáctilos de referencia cerdo, vaca, oveja y ballena con el fin de determinar sus características, su variabilidad y la distribución de los sitios polimórficos de cada proteína. La longitud de los genes codificantes de estas proteínas es, en general, similar en todas las especies comparadas, excepto ATP8 que en los camélidos muestra un codón adicional y por lo tanto es un aminoácido mas larga. Con respecto a las secuencias de las proteínas, los camélidos exhiben alta homología con las de las especies comparadas. Para COI donde los niveles de homología son los más altos, los valores van desde 93.6% con la ballena hasta 96.1 % con la vaca. Opuestamente, la menor homología se registra para ATP8 donde los valores oscilan entre 68.2 % con la ballena y 72.7 % con la vaca. Para cada proteína también se determinó el porcentaje de sitios variables totales entre los cetartiodáctilos comparados. El rango obtenido entre la proteína mas conservada (COI) y la más variable (ATP8) fue de 7.4 % a 49.3%.

En general, de los alineamientos con los cetartiodáctilos surge que un alto número de sustituciones presentes en guanaco y vicuña ocurren en sitios que en vaca, oveja, cerdo y ballena son conservados. Estas sustituciones, en su mayoría son compartidas con los camélidos del viejo mundo, bactriano y dromedario. No obstante, en todos los complejos se identificaron características particulares de estos animales.

#### **Citocromo b**

La proteína citocromo b deducida en el guanaco y la vicuña tiene una longitud de 379 aminoácidos. De acuerdo al modelo estructural obtenido en el ratón (Howell,1989), esta proteína tiene tres dominios funcionales: intermembrana (IM) , matriz (M) y transmembrana (TM).



**Fig. 6** Modelo de citocromo b (Irwin y col, 1991, adaptado de Howell,1989). Los residuos conservados entre mamíferos están representados con círculos rellenos y los variables con círculos vacíos. Las superficies externa e interna de la proteína corresponden a la parte superior e inferior de la figura respectivamente.  $Q_o$  y  $Q_i$  son los centros redox.

El alineamiento de citocromo b de los camélidos con el de otros cetartiodáctilos muestra 84 sitios polimórficos distribuidos a lo largo de la secuencia de la proteína. Semejante a lo que ocurre en otros mamíferos, la mayoría de los polimorfismos (64.6%) se localizan dentro de los segmentos TM, involucrando preferentemente cambios entre aminoácidos hidrofóbicos (I , V, L, M). Los dominios IM son los mas conservados, dado que en ellos se ubica solo el 13.9 % de los sitios polimórficos. Los resultados del presente estudio muestran que la proteína citocromo b contiene 9 sustituciones de aminoácidos propias de los camelidos (Tabla 6)

**Tabla 6.-** Localización de los aminoácidos de citocromo b propios de camélidos

| Posición AA | Guanaco/Vicuña | V/C/O/B | Localización |
|-------------|----------------|---------|--------------|
| 11          | L              | M       | NHt          |
| 46          | M              | L       | TM1          |
| 67          | A              | T       | M1           |
| 117         | I              | V       | TM3          |
| 156         | V              | I       | IM2          |
| 345         | P              | H       | IM4          |
| 353         | V              | L       | TM8          |
| 360         | S              | L       | TM8          |
| 376         | I              | L       | COOt         |

NHt, COOt: extremos amino y carboxilo terminal ,respectivamente

V/C/O/B: vaca /cerdo/oveja/ballena

L46M e I156V son las únicas sustituciones presentes en guanaco y vicuña no compartidas con bactriano y dromedario. Si bien estas dos sustituciones son

conservativas, I156V se destaca por su ocurrencia en la región funcionalmente importante IM2. Debe tenerse en cuenta que en los dominios IM residen la mayor parte de los aminoácidos que componen el centro redox Qo.

Extendiendo el alineamiento de citocromo b a otros mamíferos, se observa que las sustituciones de las posiciones 11,117, 353, 360 y 376 además de ser conservativas por involucrar cambios entre los aminoácidos M, L, V e I, se localizan en sitios que son variables entre esas especies por lo que probablemente su importancia funcional sea menor. En los camélidos, el reemplazo T67A introduce el aminoácido no polar A en lugar de un residuo polar como T. Por otra parte, la sustitución que puede considerarse más drástica es H345P, donde los camélidos han sustituido un residuo hidrofílico con carga positiva como H, por otro neutro, pequeño y no polar como P. Esta H es conservada en los mamíferos comparados, excepto en humano y chimpancé donde es sustituida por una Y.

### **Complejo NADH deshidrogenasa**

El primer complejo de la cadena respiratoria, NADH deshidrogenasa, está constituido por 46 polipéptidos, 7 de cuyas subunidades ND1, ND2, ND3, ND4L, ND4, ND5 Y ND6 son codificadas por el genoma mitocondrial. A continuación se describe la variabilidad de estas subunidades y las sustituciones que presentan guanaco y vicuña en sitios conservados en otros cetartiodáctilos.

#### **ND1**

El alineamiento de ND1 de camélidos con vaca, cerdo, oveja y ballena mostró 64 sitios variables distribuidos a lo largo de toda la proteína aunque más del 50 % se concentra en los segmentos comprendidos entre los aminoácidos 27-97 y 236-269. En la región central del alineamiento se identifican dos grandes bloques conservados separados por una región corta altamente variable. En esta proteína los camélidos exhiben 4 sustituciones propias en residuos que son conservados en el resto de los cetartiodáctilos analizados en este trabajo. (Tabla 7)

**Tabla 7** Sustituciones de aminoácidos de ND1 propios de la familia Camelidae

| AA  | GUA/VIC | V/C/O/B |
|-----|---------|---------|
| 93  | Q       | Y       |
| 96  | V       | I       |
| 97  | D       | N       |
| 243 | F       | L       |

La sustitución L243F es compartida por bactriano y dromedario en tanto que el resto son exclusivas de guanaco y vicuña. El cambio Y93Q ocurre en una posición no

conservada en mamíferos y la sustitución I96V conserva las propiedades del aminoácido reemplazado por lo que probablemente no sean relevantes.

La posición 97 es altamente conservada, estando también ocupada por una N en mamíferos tales como foca, ratón, humano y chimpancé. En esta posición, el guanaco y la vicuña presentan una sustitución N97D, donde un aminoácido sin carga como la N es sustituido por D cargado negativamente. De acuerdo a la topología transmembrana propuesta por Roth y Hagerhall (2001) para esta proteína, este último residuo, lo mismo que el 93 y 97 se ubican en segmento que une las hélices transmembrana II y III, localizado en la matriz mitocondrial.

## ND2

ND2 fue la subunidad del complejo I que mayor variabilidad mostró entre los cetartiodáctilos comparados. El alineamiento de ND2 de camélidos mostró 139 residuos variables y sólo cortos segmentos conservados. El más extenso de éstos se localiza en el centro de la secuencia, entre los aminoácidos 165 y 184. En el guanaco y la vicuña ND2 muestra 22 sustituciones en sitios conservados en otros cetartiodáctilos (Tabla 8)

**Tabla 8-** Sustituciones de aminoácidos de ND2 propios de la familia Camelidae

| AA  | GUA/VIC | V/C/O/B |
|-----|---------|---------|
| 28  | F       | L       |
| 52  | S       | A       |
| 53  | M       | T       |
| 72  | L       | M       |
| 73  | G       | A       |
| 92  | Q       | P       |
| 94  | S       | A       |
| 98  | I       | M       |
| 103 | T       | A       |
| 185 | G       | A       |
| 194 | M       | L       |
| 204 | Y       | N       |
| 209 | L       | I       |
| 227 | L       | T       |
| 247 | V       | T       |
| 248 | M       | L       |
| 249 | M       | L       |
| 261 | A       | M       |
| 285 | M       | T       |
| 308 | S       | T       |
| 328 | I       | T       |
| 343 | M       | L       |

Exceptuando T53M, M261A y L343M, estas sustituciones están también presentes en una o ambas especies de camélidos del Viejo mundo. Al igual que la mayoría de los reemplazos observados, estas tres sustituciones ocurren en posiciones que en mamíferos no se hallan conservadas. Sólo siete sitios, compartidos con bactriano y dromedario, presentan únicamente 2 variantes de aminoácidos. Una clase

compuesta por los sitios 194, 204 y 209, exhibe sustituciones en camélidos y total conservación en el resto de los animales. La primera y la última son conservativas, mientras que en la sustitución N204Y el reemplazo involucra un residuo N polar y alifático por uno Y menos polar y aromático. En la otra clase las sustituciones en los camélidos de los sitios 103, 227 y 249 son compartidas por otro animal. De éstas, A103T, también presente en foca, implica un moderado aumento de polaridad al reemplazar una A por una T. La sustitución T227L es compartida con rata e involucra, contrariamente al caso anterior, un reemplazo de un residuo T por uno hidrofóbico L.

### ND3

La secuencia de ND3 suma, entre todos los cetartiodáctilos analizados en este trabajo, 26 sitios variables localizados principalmente en los extremos NHt y COOt de la proteína. En dos de estos sitios, conservados en los otros cetartiodáctilos, el guanaco y la vicuña presentan sustituciones detalladas en la Tabla 9

**Tabla 9** Sustituciones de aminoácidos de ND3 propios de la familia Camelidae

| Posición AA | Guanaco/Vicuña | V/C/O/B |
|-------------|----------------|---------|
| 59          | I              | V       |
| 84          | H/Y            | N       |

La sustitución V59I es conservativa además de estar presente en todos los camélidos. La sustitución N84Y es compartida por vicuña, bactriano y dromedario. En esta posición guanaco exhibe una H, por lo que podría tratarse de una sustitución exclusiva de esta especie o de un sitio polimórfico en camélidos. La extensión del alineamiento a otros mamíferos, confirmó la conservación de los residuos V y N en las posiciones 59 y 84 respectivamente.

### ND4L

Esta proteína, de 98 aminoácidos, es la más pequeña de las codificadas por el genoma mitocondrial. En los cetartiodáctilos comparados se observan 27 sitios variables distribuidos en toda la extensión de la proteína, aunque ligeramente concentrados en el extremo NHt. En el guanaco y la vicuña observamos tres sustituciones en sitios invariables para las otras especies del alineamiento (Tabla 10)

**Tabla 10.** Sustituciones de aminoácidos de ND4L propios de la familia Camelidae

| AA | GUA/VIC | V/C/O/B |
|----|---------|---------|
| 10 | L       | M       |
| 50 | S       | N       |
| 81 | I       | V       |



De las tres sustituciones que presentan los camélidos M10L y V81I son conservativas y están presentes en otros mamíferos. El reemplazo N50S, presente sólo en los camélidos sudamericanos guanaco y vicuña, es no conservativo además de ocurrir en una posición totalmente conservada en los otros animales.

#### **ND4**

En el grupo de cetartiodáctilos usados como referencia el análisis de ND4 mostró 126 sitios variables. En camélidos esta proteína exhibe 19 sustituciones propias localizadas en sitios conservados en los otros artiodáctilos (Tabla 11).

**Tabla 11** Sustituciones de aminoácidos de ND4 propias de la familia Camelidae

| AA  | GUA/VIC | V/C/O/B |
|-----|---------|---------|
| 6   | F       | I       |
| 30  | Y       | H       |
| 43  | S       | N       |
| 50  | T       | L       |
| 78  | I       | M       |
| 147 | S       | L       |
| 194 | L       | F       |
| 195 | L       | M       |
| 246 | L       | I       |
| 314 | T       | A       |
| 317 | V       | I       |
| 418 | N       | K       |
| 429 | T       | S       |
| 430 | Y       | F       |
| 435 | S       | A       |
| 446 | M       | L       |
| 455 | M       | L       |
| 457 | F       | P       |
| 458 | T       | L       |

En forma similar a lo que ocurre en otras subunidades, la mayoría de las sustituciones de ND4 que presentan los camélidos ocurren en sitios no conservados o son compartidas con otros mamíferos. Las sustituciones correspondientes a una de estas dos clases son I6F, H30Y, M78I, I147S, F194L, M195L, I246L, F430Y, L455M, P457F y L458T. Las sustituciones, I317V, S429T y L446M presentes también en bactriano y dromedario, si bien son conservativas se localizan en sitios que son invariables en el resto de los mamíferos. En el caso de los residuos 50 y 314 (no se muestran en la tabla) entre mamíferos no hay conservación del aminoácido, pero prevalecen las características del mismo. En la posición 50 todos los camélidos presentan un aminoácido polar como T en tanto que en los otros mamíferos esta posición está ocupada por aminoácidos no polares como A, I o M. En otros animales el sitio 314 contiene aminoácidos hidrofóbicos tales como L, M o F; los camélidos en tanto presentan nuevamente un aminoácido polar T. Las únicas sustituciones exclusivas de guanaco y vicuña encontradas son N43S y K418N, el resto están

presentes también en uno o ambos camélidos del Viejo mundo. Ninguna de estas dos sustituciones es conservativa. El reemplazo N43S implica una reducción moderada en la polaridad. Por último, en la sustitución K418N el reemplazo implica un aminoácido cargado por otro de menor volumen y sin carga.

### ND5

La comparación de la subunidad mitocondrial ND5 entre los camélidos y los cetartiodáctilos de referencia vaca, cerdo, oveja y ballena detectó 211 sitios variables siendo la variación en el extremo NHT mayor que en la del COOt. Esta observación también reveló 21 sustituciones exclusivas de los camélidos que incluyen reemplazos entre los aminoácidos M, L, V o I lo que las define totalmente conservativas. Lo mismo ocurre con las sustituciones S por T, Y por F y D por E (Tabla 12).

**Tabla 12** Sustituciones de aminoácidos de ND5 propios de la familia Camelidae

| AA  | GUA/VIC | V/C/O/B |
|-----|---------|---------|
| 6   | T       | S       |
| 72  | H       | Q       |
| 92  | I       | V       |
| 101 | V       | M       |
| 197 | E       | D       |
| 198 | M       | L       |
| 203 | I       | M       |
| 205 | T/S     | N       |
| 210 | T       | N       |
| 365 | T       | A       |
| 383 | I       | M       |
| 429 | I       | F       |
| 433 | N       | G       |
| 467 | F       | I       |
| 470 | Y       | N       |
| 489 | A       | T       |
| 528 | F       | Y       |
| 551 | V       | S       |
| 595 | L       | I       |
| 598 | I       | S       |
| 606 | V       | E       |

El análisis interespecífico de esta subunidad muestra la mayoría de las sustituciones en sitios variables con excepción de V92I y M101V que además de ser conservativas son compartidas por los camélidos del Viejo Mundo. Los reemplazos restantes están presentes en otros mamíferos o existen en sitios variables que muestran 3 o más variantes de aminoácidos. De estos últimos se destacan las posiciones 579, donde los camélidos presentan un aminoácido cargado D en lugar de los aminoácidos sin carga N, S, o T y la posición 410 que si bien no es conservada, podría tener importancia funcional. La mutación S410F, descrita por McKenzie y

col (2007) en un paciente afectado de MELAS (miopatía mitocondrial con encefalopatía, acidosis láctica y episodios similares al ictus), sustituye la S, presente en humanos y chimpancés, por el residuo no polar aromático F. Excepto en la vicuña, en todos los camélidos esta posición está ocupada por F en tanto que la foca y el caballo presentan una L y la rata una M.

### ND6

Entre todos los cetartiodáctilos analizados en este trabajo la subunidad ND6 exhibe un alto número (22) de residuos G conservados. Los extremos de la proteína muestran baja variabilidad con excepción de los primeros 20 aminoácidos donde se concentra el 21% (12 sitios) de las 56 posiciones variables. Seis de estos sitios totalmente conservados en oveja, cerdo vaca y ballena, en camélidos muestran sustituciones ubicadas preferentemente en el extremo NHT de la proteína (Tabla 13)

**Tabla 13** Sustituciones de aminoácidos de ND5 propios de la familia Camelidae

| AA  | GUA/VIC | V/C/O/B |
|-----|---------|---------|
| 12  | M       | I       |
| 18  | I       | V       |
| 19  | S       | G       |
| 42  | M       | G       |
| 47  | Y       | F       |
| 127 | V       | I       |

De estas sustituciones, G19S y G42M es compartida con las dos especies de camelidos del Viejo mundo y V18I es compartida sólo con dromedario. Con excepción de G19S todas las sustituciones ocurren en posiciones variables entre mamíferos. Esta sustitución G19S ocurre en un sitio totalmente conservado e implica el reemplazo de un pequeño residuo G por otro más polar como S.

Recientemente, Kao y col (2003) determinaron en *P. denitrificans* la topología de la subunidad homóloga a ND6 (Nqo10), e identificaron 5 segmentos transmembrana. De acuerdo al alineamiento de la secuencia de aminoácidos de esta subunidad con la de bovino y humano y otros microorganismos (Kervinen, 2006) se puede asumir que las sustituciones de las posiciones 12, 18 y 19 observadas en los camélidos se localizan en el primer segmento transmembrana mientras que las de los sitios 42 y 47 se ubican en el segundo.

### **Complejo Citocromo c oxidasa**

Citocromo c oxidasa es un complejo multimérico involucrado en el paso oxidativo terminal del metabolismo energético catalizando la transferencia de electrones desde el citocromo c al O<sub>2</sub>.

El alineamiento de las secuencias de aminoácidos de COI de los camélidos con las de los cetartiodáctilos cerdo, oveja, vaca y ballena, mostró sólo 7 % de posiciones variables, principalmente localizadas en el extremo carboxilo terminal (COOH t). COII y CO III mostraron una variabilidad mas alta con 12.3 % de sitios polimórficos dispersos a lo largo de toda la molécula, aunque en CO II estuvieron ligeramente concentrados en el COOH-terminal. Del total de sustituciones encontradas en las proteínas de los camélidos, 21 fueron propias de este taxón, es decir ocurrieron en sitios que en los otros cetartiodáctilos son conservados. De esos cambios, casi el 50% (10 sustituciones) corresponden a COII, mientras que el 33% y el 19% a COI y COIII, respectivamente (Tabla 14)

Tabla 14 Sustituciones propias de camélidos en COI, COII y COIII

| COI | COII |        |        |           | COIII |        |        |           |      |        |        |           |
|-----|------|--------|--------|-----------|-------|--------|--------|-----------|------|--------|--------|-----------|
|     | AA # | GUAMIC | VC/O/B | Helice TM | AA #  | GUAMIC | VC/O/B | Helice TM | AA # | GUAMIC | VC/O/B | Helice TM |
| 393 | L    | F      | X      | -         | 2     | P      | A      | -         | 37   | Y      | H      | -         |
| 394 | I    | V      | X      | -         | 22    | Y      | H      | I         | 84   | V      | I      | III       |
| 405 | I    | L      | -      | -         | 27    | A      | T      | I         | 95   | S      | T      | III       |
| 406 | D    | N      | -      | -         | 30    | V      | I      | I         | 191  | S      | G      | VI        |
| 413 | Q    | H      | XI     | -         | 100   | I      | M      | -         |      |        |        |           |
| 456 | V    | M      | XII    | -         | 155   | S      | T      | -         |      |        |        |           |
| 472 | V    | I      | XII    | -         | 170   | V      | L      | -         |      |        |        |           |
|     |      |        |        |           | 175   | V      | I      | -         |      |        |        |           |
|     |      |        |        |           | 182   | V      | T      | -         |      |        |        |           |
|     |      |        |        |           | 221   | E      | K      | -         |      |        |        |           |

AA #: Posición del aminoácido en la proteína

Hélice TM: localización de la sustitución en el segmento transmembrana de la proteína

### **COI**

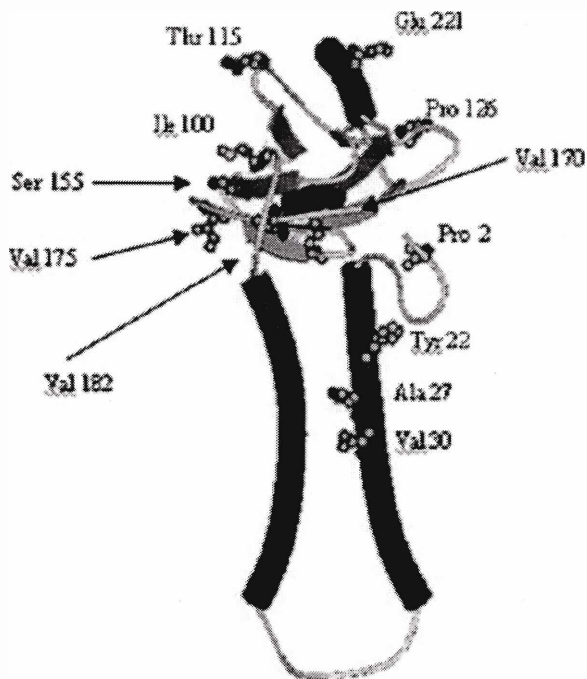
Los cambios de guanaco y vicuña hallados en CO I están localizados en su mayoría las hélices transmembrana X, XI y XII de la proteína. Todos estos cambios, excepto F393L están también presentes en bactriano y dromedario. Cuatro de ellos son conservativos por lo que probablemente resulten neutrales y no afecten la función. Otros reemplazos mas radicales, como N406D y H413Q, modifican la carga del aminoácido. Este ultimo sitio es tambien conservado en otros mamíferos, salvo en el chimpancé que presenta la misma sustitución que los camélidos.

### **COII**

Las sustituciones de las posiciones 27, 30,170 y 182 de COII son propias de los camélidos sudamericanos. La primera y la tercera son conservativas, manteniéndose las propiedades fisicoquímicas del aminoácido. La sustitución A por T en la posición 27, aunque es menos conservativa que las anteriores, es de observación frecuente entre las proteínas mitocondriales. Otro cambio de características similares es T182V .

De los seis cambios hallados en los camélidos sudamericanos también presentes en los camellos del Viejo Mundo, tres fueron conservativos, uno moderadamente conservativo y dos, A2P y E221K, cambiaron totalmente la polaridad o características del aminoácido. El último de ellos (E221K) ocurre en el extremo COOHt, altamente variable en mamíferos, mientras que el cambio A2P es más llamativo debido a que en la mayoría de los mamíferos esta posición es ocupada por Alanina. Entre los camellos del Viejo Mundo el dromedario muestra una única sustitución propia S126P, y otra D115T compartida sólo con el camello bactriano. Esta sustitución es la más sorprendente debido a que el residuo 115 es adyacente a la posición 114 de COII habiendo sido esta última involucrada en la transferencia de electrones. Esta posición es altamente conservada en mamíferos y habitualmente está ocupada por un residuo con carga negativa D o E. El cambio encontrado en los camellos introduce el residuo Treonina sin carga.

Aprovechando la disponibilidad de información estructural para este complejo, se modeló la subunidad COII basándose en la estructura de la misma proteína bovina (Figura 7) Se observa que las sustituciones propias de los camélidos halladas en COII se ubican preferentemente en la región extramembrana funcionalmente importante en la proteína.



**Figura 7** Representación de la estructura terciaria de COII de los camélidos que muestra 12 sustituciones propias del guanaco, la vicuña y los camellos del Viejo Mundo

### **COIII**

Con respecto a CO III, dos de los cambios encontrados son conservativos, en tanto que los dos restantes, Y37H y G191S introducen variaciones en las características del residuo. Este último se ubica en la hélice transmembrana IV que lo cual probablemente contribuya junto con las hélices V y VII a la estabilidad del complejo.

### **Complejo ATP sintasa**

La enzima ATP sintasa está formada como mínimo por 16 subunidades (Hong y Pedersen, 2003) de las cuales la ATP 6 y ATP 8 son codificadas por el genoma mitocondrial además de esenciales para la actividad de este complejo.

Con motivo de un trabajo previo de nuestro grupo, estos genes se amplificaron y secuenciaron en toda la familia *Camelidae*. Con el fin de obtener mayor información de las características de estas dos subunidades en camélidos, se alinearon en este caso sus secuencias con 16 mamíferos.

La comparación de las secuencias de ATP6 de los camélidos con otros mamíferos relacionados mostró, en ATP6, total conservación de los primeros seis aminoácidos y de los localizados en las vecindades de los segmentos de aminoácidos 82 al 109 y 137 al 175. El extremo 3' está también bien conservado. El resto de la proteína presenta una alta variabilidad.

En referencia a las proteínas de los otros mamíferos analizados, ATP6 de los camélidos exhibe cambios en sitios variables y en otros bien conservados. Dentro de éstos (Tabla 15) las sustituciones Q47H e I106V se observan solo en los sudamericanos, el I195V también en las especies del Viejo Mundo y en el oso. Por último, el cambio I23V es también compartido por el venado muntjak y el orangután.

El análisis de la subunidad ATP8 demostró que esta proteína es un aminoácido más extensa que la de la oveja y la vaca y cuatro aminoácidos más larga que la proteína de la ballena. A diferencia de las otras subunidades de la cadena respiratoria analizadas, la totalidad de las sustituciones que presentan los camélidos se localizan en posiciones variables de la proteína.

La proteína ATP8 es altamente variable, presentando sólo catorce residuos conservados en todas las especies alineadas. Entre éstos, el motivo N- Terminal MPQL (X4) W ha sido descrito como evolutivamente conservado en distintos mamíferos (Pedersen, 2000). También, varios residuos de lisina concentrados a lo largo del extremo C-Terminal están presentes en los camélidos. Un hecho interesante, es el hallazgo, en el bactriano y el dromedario, de un número mayor de aminoácidos cargados positivamente entre las posiciones 40 a 49. Los camellos muestran cuatro lisinas y una arginina lo que representa una carga más que las existentes en ATP8 de chimpancé y humano, siendo éstas las especies observadas en el alineamiento con mayor número de cargas positivas en esa región.

#### **4.4 Tasas relativas de evolución**

##### ***Test de tajima***

Con el objeto de evaluar si las proteínas de la cadena respiratoria en guanaco y vicuña evolucionan a diferente velocidad que en otros cetartiodáctilos se evaluaron las tasas relativas de sustitución de aminoácidos de las 13 subunidades codificadas por el ADNmt. De acuerdo a los resultados del Test de Tajima, las tasas relativas de sustitución de aminoácidos de las subunidades del complejo I, del complejo V y cit b del guanaco y de la vicuña no mostraron diferencias significativas con los otros cetartiodáctilos. Los resultados de esta prueba, para las tres subunidades del complejo IV, mostraron en camélidos un aumento significativo de la velocidad de reemplazo de los aminoácidos en COI y CO II con respecto a los otros cetartiodáctilos comparados. En el caso de COI, los camélidos sudamericanos y el bactriano del Viejo mundo muestran, con



respecto al cerdo y la oveja, un incremento significativo en las tasas de sustitución. Con respecto a la vaca, presentan un número mayor de sustituciones únicas que no llega a ser estadísticamente significativo. El dromedario en cambio, presentó, con respecto a todos los cetartiodáctilos comparados, un aumento significativo para esta subunidad. Ninguno de los camélidos mostró diferencias con el cetáceo ballena en el que también se observa, al igual que en los camélidos, un aumento de las tasas relativas de sustitución.

En COII el guanaco, la vicuña y el camello bactriano presentaron un aumento significativo en las tasas de sustitución de aminoácidos respecto de todos los cetartiodáctilos excepto la oveja. En el dromedario, esas diferencias son significativas con respecto a todos los cetartiodáctilos.

Las tasas de sustitución de COIII no presentaron diferencias significativas respecto de ninguno de los animales comparados

**Tabla 16** Test de Tajima para COI, COII y COIII

| Especie1   | Especie 2  | COI            |                |               | COII           |                |               | COIII          |                |          |
|------------|------------|----------------|----------------|---------------|----------------|----------------|---------------|----------------|----------------|----------|
|            |            | m <sub>1</sub> | m <sub>2</sub> | $\chi^2$      | m <sub>1</sub> | m <sub>2</sub> | $\chi^2$      | m <sub>1</sub> | m <sub>2</sub> | $\chi^2$ |
| Gua/vic    | Dromedario | 3              | 2              | 0.20          | 2              | 2              | 0             | 3              | 4              | 0.14     |
|            | bactriano  | 4              | 2              | 0.67          | 2              | 3              | 0.2           | 3              | 5              | 0.5      |
|            | Cerdo      | 14             | 4              | <b>5.56*</b>  | 14             | 3              | <b>7.12*</b>  | 8              | 7              | 0.07     |
|            | Vaca       | 11             | 5              | 2.25          | 15             | 3              | <b>8*</b>     | 7              | 7              | 0.00     |
|            | oveja      | 13             | 4              | <b>4.76*</b>  | 13             | 5              | 3.56          | 7              | 5              | 0.33     |
| bactriano  | Ballena    | 10             | 16             | 1.38          | 12             | 4              | <b>4**</b>    | 6              | 7              | 0.08     |
|            | Cerdo      | 17             | 5              | <b>6.55**</b> | 14             | 3              | <b>7.12*</b>  | 9              | 6              | 0.6      |
|            | Vaca       | 13             | 5              | 3.56          | 15             | 3              | <b>8*</b>     | 6              | 4              | 0.40     |
|            | oveja      | 15             | 4              | <b>6.37**</b> | 13             | 5              | 3.56          | 5              | 2              | 1.29     |
|            | Ballena    | 13             | 17             | 0.53          | 12             | 4              | <b>4**</b>    | 6              | 5              | 0.09     |
| dromedario | Dromedario | 0              | 1              | 1             | 0              | 1              | 1             | 0              | 0              | Ns       |
|            | Cerdo      | 16             | 5              | <b>5.76**</b> | 15             | 3              | <b>8*</b>     | 8              | 6              | 0.29     |
|            | vaca       | 14             | 5              | <b>4.26**</b> | 16             | 3              | <b>8.89*</b>  | 5              | 4              | 0.11     |
|            | oveja      | 14             | 4              | <b>5.56**</b> | 14             | 5              | <b>4.26**</b> | 5              | 2              | 1.29     |
|            | Ballena    | 12             | 17             | 0.86          | 13             | 4              | <b>4.76**</b> | 5              | 5              | 0.00     |
| cerdo      | Vaca       | 5              | 9              | 1.14          | 4              | 3              | 0.14          | 5              | 6              | 0.09     |
|            | Oveja      | 5              | 6              | 0.09          | 4              | 7              | 0.82          | 8              | 7              | 0.07     |
|            | Ballena    | 5              | 21             | <b>9.85*</b>  | 3              | 6              | 1             | 9              | 7              | 0.25     |
| Vaca       | Oveja      | 3              | 0              | 3             | 1              | 5              | 2.67          | 4              | 2              | 0.67     |
|            | Ballena    | 4              | 16             | <b>7.20*</b>  | 2              | 6              | 2             | 5              | 6              | 0.09     |
| oveja      | Ballena    | 2              | 17             | <b>11.84*</b> | 5              | 5              | 0             | 5              | 8              | 0.69     |

m1:sustituciones únicas de la especie 1, m2:sustituciones unicas de la especie 2

$\chi^2$  :significancia estadística, \* al 1% , \*\* al 5%

**Tasas relativas de sustitución nucleotídica en COII**

También se analizaron las tasas relativas de sustituciones nucleotídicas en COII, con el objeto de investigar si el aumento en las tasas de sustitución de aminoácidos, se deben a un aumento general de la tasa de mutación de este gen o a un aumento exclusivo de las tasas de sustitución no sinónimas

En coincidencia con los resultados del Test de Tajima, los camélidos, presentaron las tasas de sustitución no sinónimas (Ka) más altas de todos los cetartiodáctilos comparados. Este aumento es significativo con respecto al cerdo y a la vaca, aunque no en relación a la ballena ni a la oveja. Además en los camélidos del Viejo mundo se observó un aumento significativo en las tasas de sustitución sinónimas con respecto a la oveja

La Tabla 18 muestra las diferencias de las tasa relativas de sustituciones sinónimas y no sinónimas del gen CO II

En función de las observaciones anteriores se investigó además la presencia de selección positiva en el gen COII, no hallándose evidencia de la misma en el linaje de los camélidos con ninguno de los dos modelos utilizados

**Tabla 18** Diferencias entre las tasas de sustitución sinónimas y no sinónimas entre cetartiodáctilos

| Especies comparadas |            | dKs    | P     | dKa    | p             |
|---------------------|------------|--------|-------|--------|---------------|
| Guanaco             | Cerdo      | -0.128 | 0.74  | 0.025  | <b>0.01*</b>  |
|                     | Vaca       | 0.147  | 0.63  | 0.029  | <b>0.003*</b> |
|                     | Ballena    | 0.290  | 0.21  | 0.015  | 0.12          |
|                     | Oveja      | 0.384  | 0.16  | 0.020  | 0.06          |
|                     | Dromedario | -0.343 | 0.20  | 0.002  | 0.73          |
| vicuña              | Bactriano  | -0.286 | 0.21  | 0.003  | 0.54          |
|                     | Cerdo      | -0.099 | 0.80  | 0.025  | <b>0.01*</b>  |
|                     | Vaca       | 0.177  | 0.56  | 0.029  | <b>0.003*</b> |
|                     | Ballena    | 0.301  | 0.28  | 0.015  | <b>0.12</b>   |
|                     | Oveja      | 0.414  | 0.13  | 0.020  | 0.06          |
| dromedario          | Dromedario | -0.343 | 0.20  | 0.002  | 0.73          |
|                     | Bactriano  | -0.286 | 0.21  | 0.003  | 0.54          |
|                     | Cerdo      | 0.244  | 0.58  | 0.023  | <b>0.02*</b>  |
|                     | Vaca       | 0.520  | 0.18  | 0.051  | <b>0.005*</b> |
|                     | Ballena    | 0.644  | 0.09  | 0.018  | 0.08          |
| bactriano           | Oveja      | 0.758  | 0.04* | 0.018  | 0.08          |
|                     | Cerdo      | 0.187  | 0.67  | 0.021  | <b>0.02*</b>  |
|                     | Vaca       | 0.463  | 0.20  | 0.026  | <b>0.006*</b> |
|                     | oveja      | 0.700  | 0.04* | 0.016  | 0.09          |
|                     | Ballena    | 0.587  | 0.09  | 0.016  | 0.09          |
| cerdo               | Dromedario | -0.058 | 0.72  | 0.001  | 0.64          |
|                     | Vaca       | 0.276  | 0.44  | 0.004  | 0.45          |
|                     | Ballena    | 0.497  | 0.12  | 0.017  | 0.08          |
| oveja               | Oveja      | 0.513  | 0.14  | -0.005 | 0.54          |
|                     | Vaca       | -0.237 | 0.13  | 0.009  | 0.06          |

dKs y dKa: diferencias entre las tasas de sustitucion sinonimas y no sinonimas, respectivamente

\*Valores significativos ,  $p < 0.05$

**5.**

**DISCUSSION**

Desde la secuenciación del genoma mitocondrial (ADNmt) humano en 1981 (Anderson, 1981) hasta la actualidad, el número de secuencias mitocondriales completas de diferentes especies, disponibles en las bases de datos, ha crecido enormemente.

La comparación de genomas mitocondriales ha ido adquiriendo cada vez más importancia debido a su utilidad en la reconstrucción de relaciones evolutivas de diferentes organismos (Boore y Brown, 1998; Cao y col, 2000; Miya y col, 2001), en el estudio de la estructura e historia de las poblaciones de distintas especies (Rand 2001; Ingman y col, 2001) en la identificación de materiales forenses (Parson y Coble, 2001) y en la comprensión de la herencia de ciertas enfermedades humanas (Wallace, 1999)

El estudio y comparación de la molécula completa del ADNmt de especies cercanamente relacionadas provee información detallada sobre las diferencias existentes a nivel de género y especie (Árnason y col, 1993; Árnason y Gulberg, 1993).

Los camélidos sudamericanos se clasifican junto con los camellos del Viejo mundo dentro del Orden Artiodactyla, suborden Tylopoda, familia Camelidae. En la actualidad, los camélidos del Nuevo mundo están representados por las formas silvestres guanaco y vicuña y sus derivados domésticos llama y alpaca. En el Viejo mundo la Familia Camelidae está representada por el camello bactriano y el dromedario. Hasta el momento, los únicos genomas mitocondriales secuenciados completos corresponden a la alpaca de Sudamérica (GenBank [AJ560364](#)) y a los camellos de Asia ([EF212038](#) y [EF212038](#)).

En este trabajo de Tesis se secuenciaron y compararon los genomas mitocondriales del guanaco (*Lama glama*) y el de la vicuña (*Vicugna vicugna*), con el fin de establecer el grado de divergencia de estos dos taxones que, a diferencia de lo ocurrido en la alpaca (*Lama pacos*) no han sufrido procesos de hibridización en el pasado o por lo menos no existen evidencias firmes de que ello haya sucedido ( Stanley y col, 1994; Kadwell y 2001)

Una característica importante de todos los integrantes de esta familia es su particular adaptación a condiciones ambientales extremas de aridez, temperatura e hipoxia de altura. Otro de las finalidades de este trabajo fue comparar las secuencias de aminoácidos de las proteínas mitocondriales componentes de la cadena respiratoria del guanaco y de la vicuña, con las de

otros cetartiodáctilos, y en lo posible identificar características que pudieran ser de relevancia funcional en las adaptaciones ambientales de estos animales.

### **Características del genoma mitocondrial del guanaco y la vicuña**

El genoma mitocondrial del guanaco y la vicuña, determinado en este trabajo, presenta características y aspectos de organización similares a las descritas en otros mamíferos (Ursing y col, 2000; Arnason y Gulberg, 1993; Xu y Arnason, 1994; Hiendleder y col 1998; Ursing y Arnason, 1998) particularmente a la del genoma mitocondrial de la alpaca usada como referencia. En este contexto hay que mencionar el origen de replicación de la cadena liviana ( $O_L$ ) cuyas estructuras primaria y secundaria están altamente conservadas en los camélidos aquí analizados y las especies de cetartiodáctilos comparadas.

La Región Control (RC) completa del ADNmt del guanaco tiene una longitud de 1215 pb, aunque se sabe que la longitud de esta región puede variar entre individuos de una misma especie, de acuerdo al número de motivos repetidos que posea. El repetido de 30 pares de bases (pb) hallado en el guanaco, es imperfecto. Uno de los motivos, que se repite 5 veces, es idéntico al descrito en la alpaca (Genbank AJ560364). El otro, difiere en las tres últimas bases, y se repite 2 veces. En total el guanaco posee un repetido adicional a los hallados en la alpaca. Esto explica la diferencia de longitud encontrada en ambos genomas. En la vicuña fue imposible obtener una secuencia confiable de las últimas 600 bases debido a la coamplificación de dos fragmentos de tamaño similar y secuencias ligeramente diferentes que presentan homología entre sí y con la RC de guanaco y alpaca. El rediseño de primers no logró evitar este problema, obteniéndose una secuencia cuya señal muestra dos secuencias solapadas. Zhang y Hewitt (1996) han alertado sobre la "seria posibilidad de estar en presencia de copias nucleares de secuencias mitocondriales (numts) o pseudogenes, si: (i) la amplificación por PCR constantemente produce más de una banda o diferentes bandas, (ii) ambigüedad de las secuencias o background que persiste; (iii) ocurren deleciones / inserciones inesperadas..." Estas tres situaciones se presentaron en la amplificación y secuenciación de la RC del guanaco y vicuña, lo que nos induce a pensar en la presencia de pseudogenes en estos animales. En el caso del guanaco, la utilización de primers alejados del comienzo y fin de la RC, permitió amplificar un fragmento de aproximadamente 2400 bases el cual contiene la RC completa. Posteriormente, este fragmento pudo secuenciarse en ambos sentidos y

obtenerse una secuencia sin ambigüedades que ensambla perfectamente con las regiones del genoma mitocondrial que la flanquean. En la vicuña, esta estrategia no dio el resultado esperado ni permitió obtener una secuencia confiable.

A pesar de este último inconveniente, se pudo determinar utilizando las 16083 bases del ADNmt en vicuña, que ésta secuencia difiere en un 4.6 % de la correspondiente al guanaco.

En el guanaco y en la vicuña, el presente estudio identificó 22 ARNt organizados en forma idéntica a la observada en otros mamíferos. Con excepción del ARNt Ser, específico del codon AGY, el resto puede formar estructuras secundarias estables. En los camélidos analizados en este trabajo el ARNt Ser (AGY) carece del brazo DHU. Este hallazgo es por otra parte, común en animales superiores (Anderson y col, 1981). Otra característica de los ARNt mitocondrial del guanaco y la vicuña es la presencia de apareamientos de bases no estándar localizados en la región del aceptor y del brazo T $\psi$ C de los ARNt Val, Met, Lys y Thr. La observación de las estructuras de estos ARNt en el camello bactriano (Cui y col, 2007) muestra ausencia de los pares A-G y C-T en los ARNt<sup>Val</sup> y ARNt<sup>Thr</sup>. El resto de apareamientos no habituales presentes en los camélidos sudamericanos están también presentes en los camellos del Viejo Mundo.

Los genes codificantes de los ARNt pueden identificarse por la potencial capacidad de sus secuencias para formar una estructura secundaria en forma de trébol y por ciertas posiciones nucleotídicas bien conservadas. Por lo tanto, si los genes son pobremente conservados o las estructuras formadas son aberrantes, pueden producirse falsos negativos. Para identificar los genes que codifican los ARNt mitocondriales en este trabajo se utilizó el programa tRNAscan-SE (Lowe y Eddy, 1997). Con esta herramienta identificamos 21 de los 22 ARNt fracasando sólo la identificación del ARNt Ser aberrante.

Como en otros vertebrados, el ADNmt del guanaco y de la vicuña codifica 13 subunidades de proteínas de la cadena respiratoria. En general, estos genes presentan características comunes a las halladas en otros mamíferos. Con excepción de los genes ND2 y ND5 que comienzan con el codón ATA, el codón de inicio de observación mas frecuente es ATG. Tanto ATG como ATA codifican para Met. En el gen ND3, la presencia de dos codones posibles ATA y ATC, ubicados en forma contigua, dificulta determinar con exactitud el codón de inicio. Utilizando el primer codón la traducción resultante inserta una isoleucina

en la segunda posición de la proteína. Según la bibliografía y las bases de datos, los camellos bactriano (Cui y col, 2007), dromedario (GenBank NC009849) y la alpaca (GenBank AJ566364) poseen ATA como codón inicial y por lo tanto presentan la inserción de una isoleucina. Este hallazgo es sumamente llamativo ya que ampliando el análisis de las secuencias de la proteína ND3 a más de 30 mamíferos se observa que esta inserción no se halla presente en otros animales. Aunque menos frecuente, el codón de inicio ATC (segundo codón de inicio posible para ND3), ha sido reportado en ND2 de humano, ND3 de roedores, ND4L de ballena azul y ND5 de caballo, foca y ratón (Xu y Arnason, 1994). El alineamiento entre los camélidos y otros cetartiodáctilos, de las secuencias del gen ND3 y de la región que lo precede muestra, en esta zona, carencia de gaps por lo tanto podría descartarse la inserción de una Isoleucina. Utilizando el codón ATC la traducción resulta en una proteína de la misma longitud que en los otros animales. De acuerdo a los datos obtenidos en este trabajo, el inicio ATC de ND3 se ubica inmediatamente a continuación del ARNt Gly cuyas tres últimas bases son ATA. Por el contrario, en las secuencias de todos los camélidos depositadas en el GeneBank, el fin ATA de este ARNt, es también consignado como codón de inicio de ND3. Cabe aclarar que en la mayoría de los mamíferos estos dos genes no se hallan solapados. Todas las evidencias relatadas anteriormente sugieren que la inserción de la Isoleucina, que aparece en las secuencias de los camélidos depositadas en el GenBank, probablemente se deba a un error de registro del gen ND3. Con respecto a los codones de terminación, la mayoría de los genes presentan TAA. La presencia de codones de stop incompletos T o TA, en los genes CO III, ND1, ND2, ND3 y ND4 observados en los camélidos, también se han descrito en otros mamíferos euterios.

### **Comparación de las regiones codificantes**

El patrón de sustitución nucleotídica observado en los genes mitocondriales del guanaco y la vicuña es similar al de otras especies de mamíferos (Arnason y col, 1992; Xu y Arnason, 1996). Como es de esperar, la mayor variabilidad se observa en la tercera posición dado que la mayoría de los cambios resultan silentes. Por la misma razón, la segunda posición, donde los cambios son siempre no sinónimos, es la menos variable. Las transiciones en la tercera posición son el tipo de sustitución más frecuente; las transversiones, aunque menos frecuentes, también se encuentran preferentemente en esa posición.

En el ADN nuclear de los mamíferos se ha observado que las mutaciones transicionales son aproximadamente dos veces más frecuentes que las transversiones (Gojobori y col,1982; Cargill y col,1999). En contraposición a esta moderada tendencia verificada en el ADN nuclear, las transiciones en el ADN mitocondrial serían alrededor de 15 veces más frecuentes que las transversiones (Brown y col,1982; Tamura y Nei ,1983). En concordancia con estos resultados, la relación Ts/Tv hallada en el total de los genes codificantes de proteínas en el guanaco y la vicuña es 14.

La comparación de las secuencias de los genes codificantes de todas las proteínas mitocondriales de estas dos especies mostró una divergencia nucleotídica total de 5.2 %. Cuando realizamos este cálculo utilizando sólo la secuencia de Citocromo b (Citb) obtenemos valores ligeramente superiores (6.4%) pero siempre dentro del rango 6.7 / 5.8 - 8.9%, reportado por Kadwell y col (2001) y Stanley y col (1994) respectivamente, para el mismo gen. Es de destacar que en este trabajo Citb es el gen que presentó mayor número de diferencias nucleotídicas entre el guanaco y la vicuña. En el otro extremo, se encuentra ATP6 con la menor diferencia (1.9 %).

El rango de diferencias del total de aminoácidos se ubica entre 0.0 y 2.9%. El análisis de las subunidades ND4L, COI, COII y COIII y ND1 indica total igualdad en los dos camélidos en tanto que ND6 es la más variable. Llama la atención que todas las sustituciones que ocurren en los genes que codifican estas subunidades resulten sinónimas mientras que en otros como por ejemplo ND6, una de cada seis sustituciones conduce a un cambio de aminoácido. El hallazgo de estos diferentes patrones de sustitución sugiere que la presión selectiva no es igual en todos los genes.

El rango de diferencias nucleotídicas descrito en este trabajo coincide con el publicado por Arnason y col (1993) para las diferencias entre la foca gris *Halichoerus grypus* y la foca de puerto *Phoca vitulina*. Estas especies, al igual que el guanaco y la vicuña, pertenecen a géneros diferentes aunque estrechamente relacionados. Los estudios paleontológicos no han permitido datar la separación evolutiva de los géneros *Halichoerus* y *Phoca* pero las diferencias entre sus ADNmt sugieren que ello ocurrió entre 2 y 2.5 Ma antes del presente. En el caso de los camélidos, los registros fósiles indican que la separación de los géneros *Lama* y *Vicugna* ocurrió hace aproximadamente 2 Ma (Webb, 1974). Asumiendo que las transiciones en los genes ribosomales se acumulan a una tasa aproximada de 0.8% por Ma, la estimación del tiempo de



divergencia de estos dos géneros arroja un valor de 2,4 Ma. Este resultado concuerda con los datos de evidencias paleontológicas (Webb, 1974) y con la evaluación de Stanley y col. (1994) quienes utilizando Citb estiman la divergencia en 2-3 Ma .

### **Rol del ADN mitocondrial en la adaptabilidad de los camélidos**

El guanaco se caracteriza por su gran adaptabilidad a distintos ambientes la cual se ve reflejada en el amplio rango de su distribución que va desde la planicie hasta los 4200 m sobre el nivel del mar (msnm). En la actualidad, el hábitat de la vicuña es mucho más reducido, limitándose a áreas de la cordillera de los Andes localizadas entre los 3700 y 4800 msnm. La Puna andina se caracteriza por sus grandes elevaciones, su aridez y una gran oscilación térmica pudiendo registrarse temperaturas de hasta 30 grados durante el día y varios grados por debajo de 0° C durante la noche. Los camélidos sudamericanos son los mamíferos herbívoros dominantes en el inhóspito ecosistema de la Puna y de la Patagonia a los que se adaptan mediante su espeso pelaje y aspectos particulares como las almohadillas en que terminan sus patas que preservan al medio en que viven evitando la erosión de los suelos patagónicos y del altiplano.

Una de las mas llamativas adaptaciones de los camélidos es la capacidad de vivir en ambientes hipóxicos. La presión atmosférica en el altiplano, a 4.000 msnm, es aproximadamente un 40% inferior al valor observado a nivel del mar y la densidad del aire también disminuye por efecto de la altura. La exposición, durante millones de años, a estas condiciones ambientales puede haber seleccionado genes en los camélidos que expresen mecanismos eficientes de adaptación a la hipoxia (Llanos y col, 2003)

La alta tasa de mutación del ADN mitocondrial (Brown y col. 1979) y el rol central en el metabolismo energético de las proteínas que codifica hacen de él un sistema ideal para permitir la rápida adaptación a nuevas condiciones ambientales tanto en humanos como en animales.

El actual conocimiento de las interacciones funcionales entre los genes codificados por el genoma mitocondrial y la multiplicidad creciente de secuencias disponibles para el análisis comparativo, han determinado un significativo avance en la comprensión del efecto de la selección sobre este genoma (Das, 2006)

En los últimos años se han acumulado evidencias de selección positiva sobre las subunidades de enzimas mitocondriales. Un caso interesante de cambios moleculares en genes de la cadena respiratoria, es la evolución de COI en plantas carnívoras del género *Utricularia* (Jobson, 2004). En estas plantas, los residuos consecutivos Leu 113 y Ala 114, localizados en el sitio de acoplamiento con Citocromo c, han sido reemplazados por dos residuos de Cys. La formación de un puente disulfuro entre esos residuos es teóricamente posible pudiendo cambiar la estructura de COI y alterar la cinética de interacción para permitir la alta tasa respiratoria requerida por el mecanismo de captura dependiente de ATP que poseen estas plantas. Otro ejemplo de selección positiva, es la rápida divergencia de los genes de la cadena respiratoria en primates antropoides. Subunidades de los complejos I, III y IV así también como citocromo c, muestran elevadas tasas de sustituciones no sinónimas en el linaje antropoide (Grossman y col, 2004). Los reemplazos de aminoácidos tienden a ocurrir en sitios involucrados en la catálisis o de interacción con el sustrato. El cambio coordinado en la cinética enzimática sería un ejemplo de potencial evolución coadaptativa. La carga electrostática del sitio de unión de citocromo c en citocromo c oxidasa, que abarca 57 residuos de 8 subunidades, se halla drásticamente reducida. Este cambio también se encuentra complementado por dos sustituciones que alteran la carga en citocromo c. Aunque los efectos bioquímicos de estas sustituciones no han sido todavía caracterizados se sugiere que estarían relacionados a la evolución adaptativa, subyacente a la emergencia de los primates antropoides, en la que se destacan un aumento del tamaño del cerebro y de la longevidad.

En el presente trabajo de Tesis se compararon las secuencias de aminoácidos de las proteínas de la cadena respiratoria mitocondrial de los camélidos con las de otros cetartiodactilos pertenecientes a medio ambientes diferentes. Los alineamientos de las secuencias de estas proteínas mostraron, en general, un alto grado de similitud entre las especies comparadas. Las subunidades del complejo citocromo oxidasa se encuentran dentro de las más conservadas en tanto que ATP8 resulta ser la proteína más variable con casi la mitad de sus sitios no conservados.

## **Sustituciones de aminoácidos halladas en los camélidos**

### ***Complejo I NADH Deshidrogenasa***

El complejo I está localizado en la membrana interna mitocondrial desde donde cataliza la transferencia de electrones desde el NADH hacia la ubiquinona, acoplando este proceso a la traslocación de 4 protones desde el interior de la mitocondria hacia el espacio intermembrana. La estructura de alta resolución de este complejo, aún no está disponible (Schafer y col, 2006) pero estudios de microscopía electrónica indican que tanto el complejo mitocondrial I como el complejo bacteriano tienen forma de L (Grigorieff, 1998).

Las 7 subunidades del complejo NADH (ND1 a ND6 y ND4L) codificadas por el ADNmt forman parte del brazo hidrofóbico localizado en la membrana. Las bacterias contienen una enzima homóloga más simple (NDH-1) pero con el mismo mecanismo catalítico. La existencia de la NADH deshidrogenasa mitocondrial se conoce desde hace décadas no obstante, la información estructural de esta complicada enzima es bastante limitada comparada con la de otras enzimas de la cadena respiratoria (Kervinen, 2006)

### ***Subunidad ND1***

La subunidad ND1 en mamíferos es una proteína hidrofóbica cuya homóloga en el complejo mitocondrial bacteriano NDH-1 es llamada NuoH.

Según la topología transmembrana propuesta por Roth y Hagerhall (2001) esta proteína atraviesa la membrana 8 veces. Las regiones más conservadas son los dominios intermembrana donde también se localizan la mayoría de las mutaciones patogénicas reportadas en humanos. ND1 es junto con ND3 una de las proteínas del complejo I más conservadas entre los cetartiodáctilos estudiados. De acuerdo al modelo de Roth y Hagerhall, las tres sustituciones exclusivas de guanaco y vicuña Y93Q, I96V y N97D, se localizan en el segmento ubicado en la matriz mitocondrial que une las hélices transmembrana II y III. Si bien esta región está entre las más variables de la proteína, este residuo en particular es también conservado en mamíferos tales como la foca, el ratón, el humano y chimpancé. Además, la sustitución N97D de un aminoácido sin carga como la N por un D cargado negativamente es radical, por lo que no se descarta su importancia

### **Subunidad ND3**

La topología transmembrana de la subunidad ND3 ha sido estudiada en *P.denitrificans* (Di Bernardo y col, 2000). Estos autores concluyeron que esta subunidad probablemente contiene tres segmentos transmembrana. Los camélidos presentaron en esta subunidad dos cambios no compartidos con el resto de las especies de cetartiodáctilos analizadas. La sustitución N84Y es compartida por vicuña, bactriano y dromedario. En esta posición el guanaco tiene una H, por lo que podría tratarse de una sustitución exclusiva de esta especie o de un sitio polimórfico en camélidos. El cambio restante V59I presente también en camellos, es conservativo pero se localiza en un segmento de la proteína que comprende los aminoácidos 51 a 78 que es totalmente conservado en todos los mamíferos estudiados en este trabajo.

### **Subunidad ND4L**

Esta proteína es la mas pequeña de las subunidades del complejo I codificadas por el genoma mitocondrial. La topología transmembrana de la subunidad homóloga bacteriana Nqo11 has sido estudiada en *P .denitrificans* (Kao y col, 2002)

De las tres sustituciones que presentan los camélidos en esta subunidad, M10L y V81I son conservativas y están presentes en otros mamíferos u ocurren en sitios variables. El cambio N50S, exclusivo de los camélidos sudamericanos guanaco y vicuña, es el único que introduce una moderada modificación sustituyendo un aminoácido N por otro S de menor polaridad, en un sitio totalmente conservado en los otros mamíferos. Sin embargo, la escasa conservación de esta región de la proteína sugiere que no sería funcionalmente importante.

### **Subunidades ND2, ND4 y ND5**

Las subunidades ND2, ND4 y ND5 muestran similitud entre si (Fearnley y Walker, 1992) y con un tipo particular de contratransportador-cación monovalente/H<sup>+</sup> (Friedrich y Weiss, 1997) lo cual sugiere un rol posible de estas proteínas en la traslocación de protones. Entre los cetartiodáctilos analizados en este trabajo, las subunidades ND2 Y ND5 se ubican entre las más variables. Además, son las que presentan en los camélidos sudamericanos, el bactriano y el dromedario un mayor número absoluto de residuos propios. De acuerdo a estas observaciones la mayoría de las sustituciones de estas

proteínas, serían propias de la familia Camelidae. Las sustituciones T53M, M261A y L343M, exclusivas del guanaco y la vicuña, ocurren en sitios variables en otros mamíferos y dado que no implican cambios radicales de polaridad es difícil pensar que sean funcionalmente relevantes. Entre los reemplazos que también están presentes en los camellos del Viejo mundo, tres de ellos, L194M, N204Y e I209L ocurren en sitios conservados en otros mamíferos. De estos cambios, sólo el de la posición 204 implica un cambio en las propiedades del aminoácido debido a que un aminoácido polar y alifático es sustituido por otro hidrofóbico y aromático. ND4, si bien no se encuentra dentro de las proteínas mas variables, en los camélidos muestra en guanaco y vicuña, un alto número de sustituciones en sitios conservados en la vaca, el cerdo, la ballena y la oveja. Las sustituciones de las posiciones I317V y S429T, aunque son conservativas y están presentes también en los camellos del Viejo mundo, ocurren en posiciones totalmente conservadas en el resto de los mamíferos comparados. Dentro de los cambios presentes en esta subunidad se destacan las sustituciones N43S y K418N exclusivas de guanaco y vicuña que ocurren en sitios evolutivamente conservados. La primera de ellas ocurre en una posición que es conservada en todos los mamíferos analizados excepto en la rata que presenta un aminoácido W. La sustitución restante, que implica la remoción de una carga positiva y la introducción de un aminoácido neutro, ocurre en una posición conservada en todos los mamíferos analizados, excepto en chimpancé y humano, que poseen una S en ese lugar.

Como ocurre con las otras subunidades, la mayor parte de los reemplazos observados en ND5 de camélidos ocurren en sitios que son variables entre mamíferos, a excepción de las sustituciones V92I y M101V. Estas sustituciones ocurren en sitios conservados evolutivamente pero no implican diferencias en las propiedades de los aminoácidos reemplazados. Dentro del grupo cetartodáctilo analizado la única sustitución exclusiva de los camélidos guanaco y vicuña es L198M la cual, probablemente, carezca de importancia funcional, porque además de ser conservativa, este residuo es variable en otros mamíferos. Otras dos sustituciones dignas de destacar, a pesar de no pertenecer a ninguna de las categorías de sitios analizados, son los reemplazos de las posiciones 579 y 410. La primera, variable entre mamíferos, pero ocupada siempre por un aminoácido sin carga N, S, o T, en los camélidos es reemplazada por un aminoácido D con carga negativa. Si bien este cambio es radical, su importancia es discutible ya que se localiza en una región de la

proteína pobremente conservada tal como lo es el extremo carboxilo. Si embargo, en esa región se han descrito mutaciones presentes en familias de humanos con la enfermedad LHON, pero ausentes en los individuos control o con otras patologías neurodegenerativas (Mackey y Howell, 1992), por lo que no se descarta su importancia. La sustitución S410F de ND5, fué reportada por McKenzie y col en 2007, en un paciente con MELAS (encefalomiopatía mitocondrial con acidosis láctica y accidente cerebrovascular). En este caso, la mutación apareció asociada a T398A, también de ND5. Estudios de los fibroblastos del paciente y de híbridos transmitocondriales (Cybrids) generados con la mitocondria del paciente, confirmaron la asociación de la enfermedad con las mutaciones del ADNmt. En ambos casos también se describió una disminución del potencial de membrana mitocondrial y una deficiencia respiratoria ligada al complejo I. Si bien los residuos 398 y 410 en los mamíferos, en general no son conservados, la asociación de estas mutaciones a una enfermedad mitocondrial sugiere que podrían ser funcionalmente importantes. Los camélidos sudamericanos y el camello dromedario presentan, en coincidencia con la mutación hallada en el paciente de MELAS, una A en la posición 398. En la posición 410 el guanaco, el bactriano y el dromedario exhiben una F, mientras que el resto de los mamíferos muestra otros aminoácidos. Debido a la escasa información acerca de la estructura y función de esta proteína y de su interacción con otras subunidades del complejo es difícil explicar el sentido del hallazgo en los camélidos.

### **Subunidad ND6**

Recientemente, Kao y col (2003) determinaron en *P. denitrificans* la topología de la subunidad Nqo10 homóloga de ND6, e identificaron 5 segmentos transmembrana. De acuerdo al alineamiento de la secuencia de aminoácidos de esta subunidad con la de bovino, humano y microorganismos tales como *P. denitrificans* (Kervinen, 2006), cinco de las seis sustituciones propias de camélidos se localizan en los segmentos transmembrana I y II de ND6. Entre esos cambios I12M y V18I son conservativos e involucran sustituciones entre aminoácidos hidrofóbicos de frecuente observación en regiones transmembrana de otras proteínas de la cadena respiratoria (Irwin y col, 1991). En los cambios hallados en ND6 también se destacan las sustituciones G19S y G42M que involucran el reemplazo de dos glicinas en las secuencias del guanaco, la vicuña y los camellos. La primera sustitución ocurre en una posición del

segmento transmembrana I totalmente conservada en los demás mamíferos comparados. La segunda se ubica en un sitio de la región transmembrana II que se halla conservado en los cetartiodáctilos además de la foca y el caballo, pero no en el hombre, el chimpancé y la rata. En esta misma región también se localiza la sustitución F47Y, presente solo en los camélidos sudamericanos. Este último reemplazo, si bien no produce un cambio significativo en la polaridad del aminoácido sustituido, se localiza en un sitio altamente conservado entre mamíferos. En humanos, se ha descrito la mutación G36S, asociada a la patología LHON (Neuropatía Óptica Hereditaria de Leber). Esta mutación se localiza en la hélice transmembrana II, (Kervinen, 2006) donde los camélidos concentran los cambios G42M y F47Y por lo cual no se puede descartar la importancia funcional de esta región de la proteína. Otra mutación, asociada a la enfermedad mencionada arriba, es la S132L localizada en el loop que conecta las hélices transmembrana IV y V. En esta región, el guanaco y vicuña muestran una sustitución I127V. El residuo V de esa posición está conservado en todos los mamíferos analizados excepto en la secuencia de ND6 de rata que en ese sitio posee una M.

### **Citocromo b**

El complejo mitocondrial III de los mamíferos está compuesto por 11 subunidades de las cuales Citocromo b (Cit b), codificada por el genoma mitocondrial, está involucrada directamente en el transporte de electrones. La estructura y función de Cit b ha sido determinada en detalle (Degli Esposti y col, 1993; Zhang y col, 1998) y los patrones de sustitución de nucleótidos y aminoácidos, objeto de numerosos estudios (Howell, 1989; Irwin y col, 1991; Mc Clelland y col, 2001). Los camélidos muestran en esta proteína sustituciones conservativas localizadas en su mayoría en los dominios transmembrana y los extremos Amino terminal (NHt) y Carboxilo terminal (COOt). Irwin y col (1991) analizaron las secuencias de cit b en 20 mamíferos y observaron que estas dos regiones son las más variables de la proteína. Las regiones definidas como Qi y Qo son las más conservadas, siendo la superficie externa, la región que evoluciona más lento (Ver resultados Fig 5). Este hecho probablemente esté explicado por su participación directa en el centro redox Qo (Howell y Gilbert, 1988; Howell, 1989). Dentro de esa región se destaca una sustitución I156V presente en el guanaco y la vicuña que si bien no involucra cambio en la

hidrofobicidad u otra característica del aminoácido, ocurre en un sitio evolutivamente bien conservado. En todos los mamíferos comparados en este trabajo, excepto en la foca que comparte la sustitución con camélidos, se halla una I en esa posición. La sustitución T67A, presente también en los camellos bactriano y dromedario, es compartida por humanos y chimpancés. Este residuo, junto con otros cinco, ha sido propuesto como uno de los residuos clave implicados en modificaciones de la función de Citb que podrían haber ocurrido en primates pero no en otros mamíferos. Aunque esta posición no está directamente asociada a sitios redox se ubica en una región de un loop localizada cerca de la porción central del centro Qo. (Andrews y col, 1998). La sustitución H345P, si bien es radical, se localiza en la región mas variable de la superficie externa que no tiene participación en el centro redox.

### **ATP sintasa**

Este complejo consiste de dos dominios estructurales principales: uno intrínseco de membrana conocido como F<sub>0</sub> y un dominio extrínseco globular, llamado F<sub>1</sub>, unido por un tallo periférico y otro central (Walker y Dickson, 2006)

El conocimiento acerca de la estructura y el ensamblaje de las subunidades del complejo V ATP sintasa ha crecido notablemente en los últimos años (Hong y Pedersen, 2004; Walker, y Dickson, 2006). En general, aunque este proceso no es totalmente comprendido, el grado de similitud entre las estructuras de las células de mamíferos, eucariotes inferiores y procariotes sugiere un mecanismo de ensamblaje análogo al menos para el caso del dominio F<sub>1</sub>. En el caso del dominio F<sub>0</sub> la situación es más complicada debido a la creciente complejidad evolutiva de su estructura desde la bacteria hasta el hombre. Por esta razón, la secuenciación de nuevas especies y su alineamiento con secuencias disponibles en las bases de datos puede, sin duda, aportar información sobre su estructura y potencial función (Hong y Pedersen, 2004).

Similar a lo descrito por otros autores, la comparación de ATP8 de distintas especies (De Giorgi y col 1998), indica que entre los cetartiodáctilos esta proteína es la menos conservada dado que muestra variabilidad en la mitad de sus residuos. Aunque no se ha logrado identificar residuos de ATP8 específicos de los camélidos, una característica particular observada en los camellos bactriano y dromedario podría tener importancia funcional. En estas especies,



el extremo C-terminal contiene un número más alto de residuos cargados positivamente que en la misma región de otras especies. Estudios llevados a cabo en mutantes de *Saccharomyces cerevisiae* mostraron que las cargas positivas de la región C-terminal de la subunidad 8 son requeridas para el ensamblaje eficiente de la porción F0 (Grasso y col, 1991). En apoyo de esta conclusión debe mencionarse la presencia de esta región, enriquecida en aminoácidos con carga positiva, en numerosos sistemas diferentes (Nagley, 1988, De Giorgi y col, 1996)

Recientemente, Mishmar y col. (2003) sugirieron asociaciones entre variantes de las proteínas mitocondriales y adaptaciones de los ancestros del hombre a diferentes regiones del globo, encontrando una fuerte correlación entre las sustituciones de aminoácidos de genes mitocondriales particulares y distintas zonas climáticas. Entre éstas, las variantes de ATP6 que reducen la eficiencia de acoplamiento del gradiente electroquímico durante la síntesis de ATP, disminuirían la producción de ATP pero aumentarían la generación de calor, un hecho ventajoso en regiones extremadamente frías. Basándose en esta teoría Mau y col (2005) analizaron un alto número de secuencias de ATP6 en *Homo sapiens* e identificaron 25 aminoácidos que probablemente representan residuos de ATP6 relacionados con la adaptación humana. En el presente trabajo los camélidos también mostraron cambios en los residuos conservados Q47 e I106 de ATP6 que previamente fueron interpretados por Mau y col (2005) como residuos adaptativos específicos de humanos. Los hallazgos en camélidos, también podrían tener importancia adaptativa.

### **Citocromo oxidasa**

El alineamiento de las secuencias de aminoácidos, de las tres subunidades de CO, con las de otros artiodáctilos que habitan a nivel del mar y con el cetartiodáctilo ballena cuyo hábitat es diferente mostró, en CO II de la vicuña y el guanaco, un número de sitios exclusivos mas alto que el observado en otras proteínas. En los camélidos sudamericanos domésticos y en los camellos del Viejo mundo la investigación de los otros genes mitocondriales del complejo CO mostró cambios que también podrían ser de importancia. Así, COI, la subunidad mitocondrial mas grande, contiene 12 hélices transmembrana (Tzukahara y col 1996). Sustituciones no sinónimas de CO, que afectan a los aminoácidos ubicados entre las posiciones 400 a 500, han sido recientemente asociadas con la adaptación de animales nativos al ambiente

hipóxico de altura del Tibet (Xu y col, 2005). En coincidencia con estos resultados nuestro trabajo identificó 7 cambios de aminoácidos exclusivos de camélidos sudamericanos los cuales están localizados dentro de esta región, que contiene las hélices X, XI y XII pero dado que estos cambios son conservativos, asumimos que no afectan la función de la proteína y que probablemente resultan neutrales para las interacciones de COI con otras subunidades. Otros cambios de aminoácidos observados en esta región incluyen sustituciones menos conservativas como F por L en la posición 393, N por D en la 406 y H por Q en la 413, las cuales modifican el tamaño, la carga o la hidrofobicidad del aminoácido por lo que podrían tener importancia funcional.

COIII no juega un rol directo en el transporte de electrones pero está involucrada en el ensamblaje y estabilización del complejo CO (Brunori y col, 1987; Haltia y col, 1991; Tzukahara, 1996). La secuencia de esta proteína en camélidos sudamericanos muestra dos sustituciones conservativas en la hélice II la cual interactúa con las hélices IV y V de COI. También observamos los reemplazos no conservativos Y37H y G191S, ambos localizados en la hélice transmembrana IV cuya contribución, junto con las hélices V y VII, a la estabilidad de la molécula, es conocida.

COII contiene dos hélices transmembrana siendo la hélice I la que interacciona con la subunidad V codificada por el genoma nuclear. Respecto de los cetartiodáctilos comparados, los cuatro camélidos sudamericanos muestran las sustituciones conservativas T27A e I30V, la menos conservativa H22Y y la sustitución no conservativa K221E. Este último cambio es de importancia cuestionable dado que está en la región carboxilo terminal que en los mamíferos euterios es hipervariable (Adkins y col. 1996). Las sustituciones de los aminoácidos 22 y 221 son compartidas por los camélidos sudamericanos y los camellos del Viejo Mundo por lo que se asume que proceden de un ancestro común. Una observación llamativa en las dos últimas especies consiste en el cambio D115T presente en ambos camellos y el S126P exclusivo del dromedario. La sustitución del residuo 115 podría tener importancia funcional ya que junto al sitio adyacente 114 han sido involucrados en la interacción electrostática con citocromo c (Ramharack y Deeley, 1987)

En la mayoría de los mamíferos una o ambas de esas posiciones están ocupadas por aminoácidos con carga negativa salvo en los primates catarrinos, en los cuales han sido reemplazados por dos residuos pequeños de glicina sin

carga (Ramharack y Deeley, 1987). Estudios posteriores sugieren que la uniformidad en la presencia de glicina en el linaje de los catarrinos se debe a la selección positiva de estos residuos y a su preservación por selección purificadora (Grossman y col 2001). En base a esta información y dado que COII es esencial para la función de CO, no se puede descartar que un cambio en la posición 115 como el hallado en los camellos pueda tener algún efecto en la actividad de transferencia de electrones. Por otro lado, los cambios de COII encontrados en los sudamericanos, aunque no involucran residuos asociados a la transferencia de electrones, podrían modificar la interacción entre subunidades mitocondriales y nucleares. Esta suposición se basa en el hecho de que el ensamblaje de CO en mamíferos, ha mostrado ser muy sensible a pequeños cambios de aminoácidos no necesariamente involucrados en la función catalítica (Barrientos, 2001). En los primates, COII ha sido descrita como una subunidad de evolución rápida y comparaciones, basadas en las secuencias de aminoácidos y nucleótidos, mostraron que este incremento en la tasa evolutiva ocurrió durante la radiación de los primates antropoides (Adkins y Honeycutt, 1994, Schmidt y col 2005). El estudio de las tasas relativas de evolución de esta subunidad mediante el test de Tajima mostró en los camélidos sudamericanos, una tasa de reemplazo de aminoácidos elevada respecto de cerdo, vaca y ballena. En el caso de la oveja, si bien guanaco y vicuña presentan un número de sustituciones mayor, no llega a ser significativo. En los camellos del Viejo mundo este incremento es también significativo con respecto a la oveja. Para la subunidad COI, los camélidos sudamericanos muestran un aumento significativo con respecto a oveja y cerdo, pero no a vaca y ballena. En esta última especie, se observan también tasas relativas de evolución elevadas con respecto a los otros artiodáctilos por lo que probablemente, no se detecten las diferencias con camélidos. COIII al igual que las subunidades de todos los demás complejos de la cadena respiratoria parecen evolucionar a la misma velocidad en camélidos que en otros cetartiodáctilos, ya que en todos los casos el test de Tajima confirmó la hipótesis de reloj molecular.

Para explicar el incremento en las tasas de cambios de aminoácidos de COII en el linaje de los camélidos podríamos recurrir a dos argumentos alternativos: i) relajación de las restricciones funcionales de la enzima; ii) evolución adaptativa involucrando una modificación de la función.

El aumento exclusivo de las tasas de sustitución no sinónimas, encontrado en los camélidos, permite descartar que el incremento en la tasa evolutiva de COII se deba a un aumento en la tasa de mutación, porque de ser así, la misma afectaría tanto las tasas de sustitución sinónimas como las no sinónimas.

La mayoría de las pruebas utilizadas para determinar selección positiva aplican la fórmula de medida del radio Ka/Ks y toman como resultado favorable el valor mayor de 1. En los camélidos, utilizando el programa PAML (Yang, 1997) no se detectó evidencia de selección positiva en COII. Sin embargo, un incremento en el reemplazo de aminoácidos, cuando está teniendo lugar la adaptación, seguido de una disminución en la tasa, cuando las mutaciones son mantenidas por selección purificadora, serían los signos más probables de un proceso de selección positiva (Wu y col. 1997). Asumiendo que los cambios en los linajes ancestrales de los camélidos fueron ventajosos y seleccionados positivamente, en los linajes descendientes deberían mantenerse por selección purificadora.

## Conclusiones

- Se obtuvo la secuencia completa del genoma mitocondrial del guanaco y la totalidad menos 600 pb del ADNmt de la vicuña. La comparación de ambos genomas permitió confirmar la hipótesis de una diferenciación genética baja (4.6%) pero acorde con el escaso tiempo de divergencia de estas dos especies. Estudios futuros proyectan completar la información deficiente en la vicuña.
- El hallazgo de secuencias similares a Región Control pero con numerosas sustituciones, sumado a la presencia de señales solapadas en los electroferogramas, sugiere, fuertemente, la presencia de copias del genoma mitocondrial en el genoma nuclear (numts). Este hallazgo es de suma importancia, dada la amplia utilización que tiene el ADNmt en estudios poblacionales y filogenéticos.
- En todas las subunidades de las proteínas de la cadena respiratoria codificadas por el ADNmt, excepto ATP8, se identificaron sustituciones de aminoácidos propias del guanaco y de la vicuña. La presencia de la mayoría de estas sustituciones en el genoma de los camellos sugiere un origen ancestral previo a la separación de camélidos sudamericanos y camellos.
- Es oportuno destacar que algunos de los reemplazos hallados en el genoma del guanaco y de la vicuña, son radicales y ocurren en sitios evolutivamente conservados, como por ejemplo N97D en la subunidad I de la NADHdeshidrogenasa (NDI). Otros cambios se localizan en regiones en las que se han descrito mutaciones asociadas a patologías mitocondriales, como es el caso de los cambios hallados en ND6 y la sustitución I156V, cerca del centro catalítico de citocromo b. Además es necesario resaltar el hallazgo de sustituciones semejantes a las señaladas por otros autores como residuos adaptativos en otras especies.

- Las proteínas de la cadena respiratoria en la familia Camelidae parecen evolucionar a una velocidad similar a la del resto de los cetartiodáctilos, con excepción de COII que presenta un aumento en las tasas relativas de sustitución de aminoácidos en todos los camélidos.
- Si bien no pudo ser probada la presencia de selección positiva en estos linajes, COII del bactriano y el dromedario presentan una sustitución radical (D114T) en un residuo que ha sido involucrado directamente en la transferencia de electrones. La remoción de una carga negativa de esa posición podría tener relevancia funcional en la proteína de estos animales que también están adaptados a hábitats rigurosos
- Este trabajo constituye el primer aporte al conocimiento del genoma mitocondrial completo del guanaco y de 16083 pb de la vicuña. La extensión de este estudio a un número mayor de individuos de cada especie facilitará el conocimiento de la variabilidad genómica interespecífica, así como también de los polimorfismos de las proteínas que codifica este genoma.
- La principal utilidad de la secuenciación de genomas mitocondriales completos es que, mediante su depósito en una base de datos de dominio público, esa información queda disponible para su uso, no sólo en filogenia y evolución molecular, sino en cualquier otro tipo de estudios que la requieran.

## **Bibliografía**

- 1- Abrahams JP, Leslie AG, Lutter R, Walker JE (1994). Structure at 2.8 Å resolution of F<sub>1</sub>-ATPase from bovine heart mitochondria. *Nature* 370:621–628.
- 2-Adkins R y Honeycutt R (1994) Molecular phylogeny of the superorder Archonta. *J.Mol.Evol.* 38 215-231
- 3- Adkins R, Honeycutt R y Disotell T (1996) Evolution of eutherian cytochrome c oxidase subunit II: heterogeneous rates of protein evolution and altered interaction with cytochrome c. *Mol. Biol. Evol.* 13 1393-1404.
- 4-Anderson S, Bankier AT, Barrell BG, de-Brujin MHL, Coulson AR, Drouin J, Eperon IC, Nierlich DP, Roe BA, Sanger F, Schreier HP, Smith AJH, Stader R, Young IG (1981) Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature* 290 427-465
- 5-Anderson S, de Bruijn MH, Coulson AR, Eperon, IC, Sanger F, Young IG, (1982) Complete sequence of bovine mitochondrial DNA. Conserved features of the mammalian mitochondrial genome. *J. Mol. Biol.* 156, 683–717.
- 6-Andrews TD, Jermiin LS, Easteal S, (1998) Accelerated evolution of cytochrome b in simian primates: adaptive evolution in concert with other mitochondrial proteins? *J Mol Evol.* 47(3):249-57
- 7-Andrews TD y Easteal S (2000) Evolutionary rate acceleration of cytochrome c oxidase subunit I in simian primates. *J.Mol.Evol.* 50 562–568.
- 8-Arnason U y Johnsson E (1992) The complete mitochondrial DNA sequence of the harbor seal (*Phoca vitulina*) *J.Mol.Evol.* .34:493-505
- 9-Arnason U y Gulberg A(1993) Comparison between the complete mtDNA of the blue and the fin whale, two species that can hybridize in nature. *Mol. Biol. Evol.* 37 312-322
- 10-Arnason U, Gullberg A, Gretarsdottir S, Ursing B, Janke A (2000) The mitochondrial genome of the sperm whale and a new molecular reference for estimating eutherian divergence dates. *J Mol Evol.* 50(6):569-78.
- 11-Arnason U, Gulberg A, Janke A (2004) Mitogenomic analyses provide new insights into cetacean origin and evolution. *Gene* 333 27-34
- 12-Attardi G y Schatz G (1988) Biogenesis of mitochondrion.*Annu Rev Cell Biol* 4,289-333
- 13-Bancroft J (1946) *Researches in prenatal life.*Blackwell.Oxford.En: Land S. (2004)
- 14-Banchero N, Grover RF y Will JA (1971) Oxygen transport in the llama (*Lama glama*) *Respir. Physiol.* 13:102-115



- 15-Barrientos A, Muller S, Dey R, Wienberg J y Moraes C (2001) Cytochrome c Oxidase Assembly in Primates is Sensitive to Small Evolutionary Variations in Amino Acid Sequence *Mol Biol. Evol* 17(10):1508-1519.
- 16-Bogner P, Csutora P, Cameron IL, Wheatley DN, Miseta A (1998) Augmented water binding and low cellular water content in erythrocytes of camel and camelids. *Biophys J.* 75(6):3085-91.
- 17-Boore JL y Brown VM (1998). Big trees from little genomes: Mitochondrial gene order as a phylogenetic tool. *Curr. Opin. Genet. Dev.*, 8(6):668-674
- 18-Brown W, Prager E y Wilson A (1979) Rapid evolution of animal mitochondrial DNA. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 76, 1967-1971.
- 19-Brunori M, Antonini G, Malatesta F, Sarti P y Wilson MT (1987) Cytochromec oxidase. Subunit structure and proton pumping. *Eur J. Biochem.* 169 1-8
- 20-Burke P, Poyton R (1998) Structure/ function of oxygen-regulated isoforms in cytochrome c oxidase. *J Exp. Biol.*, 201, 1163-1175.
- 21-Cabrera A. (1932). Sobre los camélidos fósiles y actuales de la América austral. *Revista del Museo de la Plata* 33:89-117
- 22-Cabrera A. Y J. Yepes (1960) *Mamíferos Sudamericanos*. Ediar, Buenos Aires, 625 pp.
- 23-Cao Y, Fujiwara M, Nikaido M, Okada M, y Hasegawa M . Interordinal relationships and timesecale of eutherian evolution as inferred from mitochondrial genome data. *Gene*, 259:149-158, 2000.
- 24-Capaldi R, Malatesta F y Darley-USmar V (1983) Structure of cytochrome c oxidase. *Biochemica et Biophysica Acta* 135-148
- 25-Capanna E y Civatelli M (1965) The Chromosomes of Three Species of Neotropical Camelidae. *Mammalian Chromosomes Newsletter* 17, 75.
- 26-Canutescu A, Shelenkov AA y Dunbrack RL (2003) A graph-theory algorithm for rapid protein side-chain prediction. *Protein Science* 12, 2001-2014.
- 27-Cardozo A.(1954). *Los Auquénidos*. Editorial Centenario, La Paz, 284 pp.
- 28-Cargill M, Altshuler D, Ireland J, Sklar P, Ardlie K y col (1999). Characterization of single nucleotide polymorphisms in coding regions of humans genes. *Nat.Genet* 231-238
- 29-Caruso U, Adami A, Bertini E, Burlina AB, Carnevale F, Cerone R, Dionisi-Vici C, Giordano G, Leuzzi E, Parenti G, Savasta S, Uziel G y Zeviani M.

- (1996) Respiratory-chain and pyruvate metabolism defects: Italian collaborative survey on 72 patients. *J. Inherit. Metab. Dis.* 19 143–148
- 30-Chandel NS, Maltepe E, Goldwasser E, Mathieu CE, Simon NC, y Scumacker P (1998) Mitochondrial reactive oxygen species trigger hypoxia-induced transcription. *Proc.Natl.Acad Sci USA* 95 11715-11720
- 31-Cook OF (1925) Perú as a center of domestication. *Journal of Heredity.* **16**
- 32-Cui P, Ji R, Ding F, Qi D, Gao H, Meng H, Yu J, Hu S, Zhang H (2007) A complete mitochondrial genome sequence of the wild two-humped camel (*Camelus bactrianus ferus*):an evolutionary history of camelidae .*BMC Genomics* 8:241
- 33-Dalziel A, Moyes C, Fredriksson E, Loughheed S(2006) Molecular evolution of cytochrome c oxidase in high-performance fish (Teleostei:Scombroidei) *J.Mol.Evol.* 62 319-331
- 34-Darwin C (1868) *The variation and plants under domestication*. London: Murray. En:Wheeler (1994)
- 35-Das J, Miller ST y Stern DL (2004). Comparison of diverse protein sequences of the nuclear-encoded subunits of cytochrome c oxidase suggests conservation of structure underlies evolving functional sites.*Mol Biol Evol* 21:1572–1582.
- 36- Das J (2006) The role of mitochondrial respiration in physiological and evolutionary adaptation. *BioEssays* 28:890–901
- 37-David P y Poyton RO (2005) Effects of a transition from normoxia to anoxia on yeast cytochrome c oxidase and the mitochondrial respiratory chain Implications for hypoxic gene induction. *Biochimica et Biophysica Acta*
- 38-De Giorgi, A. Martiradonna, G. Pesole y C Saccone(1997) Lineage-Specific Evolution of Echinoderm Mitochondrial ATP Synthase Subunit 8.29 (3) 233-239
- 39-De Haan C, Habibi-Nazhad B, Yan E, Salloum N, Parliament M, Allalunis-Turner J. (2004) Mutation in mitochondrial complex I ND6 subunit is associated with defective response to hypoxia in human glioma cells *Molecular Cancer* 3:19
- 40-Di Bernardo S, Yano T y Yagi T (2000) Exploring the membrane domain of the reduced nicotinamide adenine dinucleotide-quinone oxidoreductase of *Paracoccus denitrificans*:characterization of the NQO7 subunit. *Biochemistry* 39: 9411-9418.
- 41-Doan J, Schmidt T, Wildman D, Goodman M, Weiss M, Grossman L (2005) Rapid Nonsynonymous Evolution of the Iron-Sulfur Protein in Anthropoid Primates. *J Bioenerg Biomemb* 37,35-41

- 42-DiMauro, S. and Schon, E. A. (2001) Mitochondrial DNA mutations in human disease. *Am. J. Med. Genet.* 106, 18-26
- 43-DiMauro S y Schon EA (2003) Mitochondrial respiratory-chain diseases. *N Engl J Med* 348:2656-2668.
- 44-Esposti MD, De Vries E, Crimi M, Ghelli A, Patarnello T y Meyer A (1993). Mitochondrial cytochrome b: evolution and structure of the protein. *Biochim. Biophys. Acta* 1143:243-271.
- 45-Faige F.(1929) *Haustierkunde U Hastiereuscht.* En :Wheeler (1994)
- 46-Fernández-Baca S. (1971) *La Alpaca, Reproducción y Crianza.* Lima, Instituto Veterinario de Investigaciones Tropicales y de Altura, Boletín de Divulgación 7.
- 47-Fernández-Silva P, Enriquez J y Montoya J (2003) Replication and transcription of mammalian mitochondrial DNA. *Experimental Physiology* 88.1, 41-56.
- 48-Flores Ochoa J (1982). Causas que Originaron la Actual Distribución Espacial de las Alpacas y Llamas. en: *El Hombre y su Ambiente en los Andes Centrales*, eds. L. Millones y H. Tomoeda, Museo Nacional de Etnología, Osaka, *Estudios Etnológicos Senri* 10, 63-92.
- 49-Fowler M y Zinkl J.(1989) Reference range for hematologic and serum biochemical values in llamas (*Lama glama*). *Am J.Vet. Res.* 50(12) 2049-2053
- 50-Franklin (1982) In: *Mammalian biology of South America*, vol. 6: Biology, ecology and relationship to man of the South American camelids. (Mares, M.A and Genoways H.H, eds), *The Pymatuniang Symposia in Ecology*, Pittsburgh. 457-489.
- 51-Friedrich T y Weiss H (1997) Modular evolution of the respiratory NADH:ubiquinone oxidoreductase and the origin of its modules. *J Theor Biol* 187: 529-540.
- 52-Giulivi G, Poderoso J, Bovris A, (1998) Production of nitric oxid by mitochondria. *J Biol Chem.* 273 11038-11043
- 53-Gojobori T, Li WH, Graur D (1982) Patterns of nucleotide substitution en pseudogenes and functional genes. *J.Mol.Evol.* 18, 360-369
- 54-Gray A. (1954) *Mammalian Hibrids.* Slough, Commonwealth Agricultural Bureaux
- 55-Grossman L y Goodman, M (2001) Molecular evolution of the aerobic metabolism in primates. *Mol. Phylogenet. Evol.* 18. 26-36
- 56-Grossman LI, Wildman DE, Schmidt TR, Goodman M (2004). Accelerated evolution of the electron transport chain in anthropoid primates.

Trends Genet 20:578–585.

57-Haltia T, Saraste M, y Wikstrom M (1991) Subunit III of cytochrome c oxidase is not involved in proton translocation: a site-directed mutagenesis study. *EMBO J* 10 2015-2021

58-Harrison JA (1985) Giant camels from the Cenozoic of North America. *Smithsonian Contribution to paleobiology* 5-7:1-29

59-Hemmer H (1990) *Dosmetication: the decline of environmental appreciation*. Cambridge University Press.

60-Herre W y Rohrs M (1973) *Haustiere-zoologisch gesehen*. Stuttgart: Gustav Fisher Verlag. En: Wheeler (1994)

61-Hiendleder S, Lewalski H, Wassmuth R, Janke A (1998) Complete mitochondrial DNA sequence of a domestic sheep (*Ovis aries*) and comparative data from another mayor haplotype. *Mol Biol. Evol* 47, 441-448

62-Higgins D, Thompson J, Gibson T, Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* 22:4673-4680.

63-Hochachka PW, Sanley C, Merkt J y Sumar Kalinowski J (1982) Metabolic meaning of elevated level of oxidative enzymes in high altitude adapted animals: an interpretative hypothesis

64-Hoffstetter R (1986) High Andean Mammalian Faunas During the Plio-Pleistocene. *High Altitude Tropical Biogeography* (ed. por F. Vulleumier y M. Monasterio), pp. 218-245 Oxford University Press, Oxford.

65-Hong S, y Pedersen PL. (2003). ATP synthases: Insights into their motor functions from sequence and structural analyses *J. Bioenerg. Biomembr.* **35**, 95–120.

66-Hong S y Pedersen, P (2004). Mitochondrial ATP Synthase: A Bioinformatic Approach Reveals New Insights About the Roles of Supernumerary Subunits g and A6L. *J. Bioenerg. Biomembr* 36 (6) 515-523

67-Hoppeler H, Vogt M, Weibel E, Fluck M, Response of skeletal muscle mitochondria to hypoxia. *Experimental Physiology.* 88 (1) 109-119

68-Howell N (1989). Evolutionary conservation of protein regions in the proton-motive cytochrome b and their possible roles in redox catalysis. *J. Mol. Evol.* 29 157- 169.

69-Howell N, Kuback AI, . Xu M y Mc Cullough DA (1991) Leber hereditary optic neuropathy: involvement of the mitochondrial NDI gene and evidence for an intragenic suppressor mutation. *Am. J. Hum. Genet.* 48 935-942.

70- Hsu TC. y Benirschke K (1967) *Vicugna vicugna* (Vicuña./  $2n=74$ ). *An Atlas of Mammalian Chromosomes* (comp. por T.C. Hsu y K. Benirschke) 1:Folio 40. Springer Verlag, New York.

71- Ingman M, Kaessmann H, Paabo S, Gyllensten U. Mitochondrial genome variation and the origin of modern humans. *Nature*, 408:708–713, 2001.

72-Irwin D M, Kocher TD y Wilson AC (1991). Evolution of the cytochrome b gene of mammals. *J. Mol. Evol.* 32: 128-144.

73- Iwata S, Lee JW, Okada K, Lee JK, Iwata M, y col. (1998). Complete structure of the 11-subunit bovine mitochondrial cytochrome bc<sub>1</sub> complex. *Science* 281:64–71.

74-Janke A, Xu X y Arnason U (1997) The complete mitochondrial genome of the wallaroo (*Macropus robustus*) and the phylogenetic relationship among Monotremata, Marsupialia and Eutheria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94:1276-1281

75-Jobson RW, Nielsen R, Laakkonen L, Wikström M, Albert VA (2004) Adaptive evolution of cytochrome c oxidase: infrastructure for carnivorous plant radiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101:18064-18068

76-Jurguens KD, Pietschmann M, Yamaguchi K y Kleinschmidt T (1988). Oxygen Binding Properties, Capillary Densities and Heart Weights in High Altitude Camelids. *Journal of Comparative Physiology B* 158: 469-477.

77-Kadwell M, Stanley H, Fernandez M, Wheler J, Rosadío R, Brudford M (2001). Genetics analysis reveals the wild ancestors of the llama and the alpaca. *Proc.R.Soc.Lond.B* 268- 2575-2584

78-Kao MC, Di Bernardo S, Matsuno-Yagi A y Yagi T (2002) Characterization of the membrane domain Nqo11 subunit of the proton-translocating NADH-quinone oxidoreductase of *Paracoccus denitrificans*. *Biochemistry* 41: 4377-4384.

79-Kao MC, Di Bernardo S, Matsuno-Yagi A y Yagi T (2003) Characterization and topology of the membrane domain Nqo10 subunit of the proton-translocating NADH-quinone oxidoreductase of *Paracoccus denitrificans*. *Biochemistry* 42: 4534-4543

80-Kervinen M (2006) Membranous core domain of complex I and mitochondrial disease modeling. Tesis doctoral. Universidad de Helsinki, Finlandia. pp 96

81-Kimura (1983) *The neutral theory of molecular evolution*. Cambridge University Press, Cambridge, UK

82-Kimura H, Weisz A, Kurashima Y (2000) Hypoxia response element of the human vascular endothelial growth factor gene mediates transcriptional regulation by nitric oxide: control of hypoxia-inducible factor-1 activity by nitric oxide. *Blood* 95,189-187

83-Koford C.B.(1957). The Vicuña and the Puna. *Ecological Monographs* 27(2) 153-219.

84-Kraus F y Miyamoto MM (1991) Rapid cladogenesis among the pecoran ruminants:evidence from mitochondrial DNA sequences.*Syst. Zool.*40:117-130

85-Kruska D (1982) Hirngrößenänderungen bei Tylopoden während der Stammesgeschichte und in der Domestikation. *Verhandlungen der Deutschen Zoologischen Gesellschaft* 75:173-183. En Wheeler (1994)

86-Kumar, S., Tamura, K. and Nei M (2004). MEGA3.1: Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment *Briefings in Bioinformatics* 5 150-163.

87-Kwast KE, Burke PV, Staahl BT, Poyton RO (1999) Oxygen sensing in yeast: evidence for the involvement of the respiratory chain in regulating the transcription of a subset of hypoxic genes, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96 5446-5451.

88-Land S (2004) Hochachka's "Hypoxia defense strategies" and the development Of the pathway for oxygen.*Comparative biochemistry and physiology,Part B* 139 415-433

89- Leese HJ (1991) Metabolism of the preimplantation embryo. *Oxf. Rev. Reprod. Biol* 13 35-72

90-Llanos A, Riquelme R, Sanhuesa E, Hanson M.y Giussani D. (2003). High altitude medicine & Biology, 4 (2) 193-201.

91-Lopez Aranguren D.J. (1930) Camélidos fósiles argentinos. *Anales de la Sociedad Científica Argentina (Buenos Aires)* 109: 15-35, 97-126.

92- Lowe TM y Eddy SR (1997) tRNAscan-SE: A program for improved detection of transfer RNA genes in genomic sequence. *Nucl. Acids Res.* 25: 955-964.

93-Mau B, Lee HM, Tzen H (2005). Identification of Human-Specific Adaptation Sites of ATP6 *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1042: 142-147

94-McKenzie M, Liolitsa D, Akinshina N, Campanella M, Sisodiya S, Hargreaves I, Nirmalanathan N, Sweeney MG, Abou-Sleiman PM, Wood NW, Hanna MG, Duchon MR Mitochondrial *ND5* gene variation associated with encephalomyopathy and mitochondrial ATP consumption (2007)*J Biol. Chem.* 282(51):36 845-52.

95-Mackey D y Howell N (1992) A Variant of Leber Hereditary Optic Neuropathy Characterized by Recovery of Vision and by an Unusual Mitochondrial Genetic Etiology *Am. J. Hum.Genet.* 51:1218-1228

96-Martin R (1990) Primate origins and evolution:A phylogenetic reconstruction Princeton University Press,Princeton, New Jersey

97-McClellan D y McCracken G (2001) Estimating the influence of selection on the variable amino acid sites of cytochrome b protein functional domains. *Mol.Biol.Evol.* 18(6) 917-925

98-Miller S, Rottman J y Taber R (1973). Dwindling and Endangered Ungulates of Chile: *Vicugna*, *Lama*, *Hippocamelus* and *Pudu*. *North American Wildlife Conference* 38:55-68.

99-Mishmar D, Ruiz-Pesini E, Golik P, Macaulay V, Clark AG, y col. (2003) Natural selection shaped regional mtDNA variation in humans. *Proc Natl Acad Sci USA* 100:171-176.

100-M. Miya, A. Kawaguchi y M. Nishida. Mitogenomic exploration of higher teleostean phylogenies: A case study for moderate-scale evolutionary genomics with 38 newly determined complete mitochondrial DNA sequences. *Mol. Biol. Evol.*, 18:1993-2009, 2001

101-Miyamoto MM y Boyle SM (1989) The potential importance of the mitochondrial DNA sequences data to eutherian mammalian phylogeny. En: Fernholm B, Bremer K, Jornvall H (eds) *The hierarchy of life* Elsevier, Amsterdam, pp437-450

102-Miyamoto MM, Kraus F, Ryder OA (1990) Phylogeny and evolution of antlered deer determined from mitochondrial DNA sequences. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87 :6127-6131

103-Montgelard C, Catzeflis F, Douzery E (1997) Phylogenetic relationship of artiodactyls and cetaceans as deduced from the comparisons of cytochrome b and 12S rRNA mitochondrial sequences *Mol.Biol. Evol.* 14(5) 550-559

104-Nei M y Kumar S Evolutionary change of DNA sequence. En: *Molecular evolution and phylogenetics.* (2000) Oxford University Press NY pag. 33-71

105-Nicholas K y Nicholas H (1997) GeneDoc: A tool for editing and annotating multiple sequence alignments. Distributed by the author. <http://www.psc.edu/biomed/genedoc>.

106-Ojala D, Montoya J y Attardi G. (1981). *Nature* 290: 470-474

107-Osgood WH (1916) Mammals of the Collins-Day South American expedition. *Field Museum of Natural History: Zoology*, 10:199-217 En: Franklin (1982)

108-Pamilo P, Bianchi NO (1993) Evolution of the Zfx and Zfy genes: rates and interdependence between genes *Biol Mol Evol* 10 271-281

109- T.J. Parsons and M.D. Coble (2001) Increasing forensic discrimination of mitochondrial DNA testing through the analysis of the entire mitochondrial DNA genome. *Croatian Med. J.*, 42:304-309

- 110-Pedersen PL, Ko YH y Hong S (2000). *J. Bioenerg. Biomembr.* **32**, 325-332.
- 111-Pereira SL (2000) Mitochondrial genome organization and vertebrate phylogenetics. *Genetics and Molecular Biology*. 23 (4) 745-752
- 112-Picchini M, Kleinschmidt T, Jurguens KD, Baunitzer G (1990). Primary structure and oxygen-binding properties of the hemoglobin from guanaco (*Lama guanicoe*, Tylopoda) *Biological chemistry Hoppe-Seyler* 371:641-648
- 113-Raedeke K. (1978) El guanaco de magallanes. Chile. Su distribución y biología. CONAF Publicación Técnica N ° 4. 182 pp.
- 114-Ramharack, P and Deeley, RG (1987). Structure and evolution of primate cytochrome c oxidase subunit II gene. *J Biol. Chem.* 262 14014-14021
- 115-Rand D, Weinreich D, Cezairilyan B (2000) Neutrality test of conservative-radical amino acid changes in nuclear-and mitochondrially-encoded proteins. *Gene* 291 115-125
- 116- Rand DM (2001) The units of selection on mitochondrial DNA. *Ann. Rev. Ecol. Syst.*, 32:415-448
- 117-Randi E, Lucchini V (1998) Organization and evolution of the mitochondrial DNA control region in the avian genus *Alectoris*. *J. Mol. Evol.* 47, 149- 157
- 118-Reynafarje B, Faura CJ, Villavicencio D, Curaca A, Oyola L, Contreras L, Vallenase E, y Faura A (1975) Oxygen transport of hemoglobin in high altitude animals (*Camelidae*) *J.Appl.Physiol*
- 119-Robinson-Rechavi M, Huchon D (2000) RRTree: Relative-rate tests between groups of sequences on a phylogenetic tree. *Bioinformatics* 16: 296-297
- 120- Roth R y Hägerhäll C (2001) Transmembrane orientation and topology of the NADH:quinoneoxidoreductase putative quinone binding subunit NuoH. *Biochim Biophys Acta* 1504: 352-362
- 121-Rozen S. y Skaletsky H. (2000) Primer 3 on the WWW for general users and for biologist programmers. In: Krawetz S, Misener S (eds) *Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology*. Humana Press, Totowa, NJ, pp 365-386.
- 122-Ruiz-Pesini E, Mishmar D, Brandon M, Procaccio V . Wallace DC (2004) Effects of purifying and adaptive selection on regional variation in human mtDNA *Science*.303(5655) 223-6.
- 123-Saluda-Gorgul A, Jaworsky J y Greger J (1990) Nucleotide séquence of satellite I and II DNA from alpaca (*Lama pacos*) genome. *Acta Biochim. Pol.* 37(2), 283-297.



- 124-Sambrook J, Fritsch E. y Maniatis T (1989) *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*. 2<sup>nd</sup> edition.
- 125-Schmidt T, Wildman D, Uddin M, Opazo J, Goodman M y Grossman L. (2005). *Proc. Natl.acad. Sci* 102 (18) 6379-6384
- 126-Semenza GL, Roth PH, Fang HM, Wang GL (1994) Transcriptional regulation of genes encoding glycolytic enzymes by hypoxia inducible factor-1
- 127-Semorile L, Crisci J y Vidal-Rioja L (1994). Restriction site patterns in the ribosomal DNA of Camelidae. *Genetica* 92:115-122.
- 128-Shadel GS y Clayton DA (1997) Mitochondrial DNA maintenance in vertebrates. *Annu. Rev. Biochem.* 66 409-435
- 129-Southern SO, Southern PJ, Dizon A (1988). Molecular characterization of a cloned dolphin mitochondrial genome. *J. Mol. Evol.* 28, 32– 40.
- 130-Stanley H, Kadwell M ; Wheeler J (1994 ) Molecular evolution of the family Camelidae: a mitochondrial DNA study *Proc . R. Soc.Lond B* 256 1-6.
- 131-Tajima F. (1993) Simple Methods for Testing the Molecular Evolutionary Clock Hypothesis. *Genetics*, 135. 599-607.
- 132-Thomas O (1891) Notes on some ungulates mammals. *Proceedings of the Zoological Society of London* 384-389.En: Wheeler (1994)
- 133-Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F y Higgins D.G. (1997) The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research*, 24:4876-4882
- 134 -Tsukihara T, Aoyama H, Yamashita E, Tomizaki T, Yamaguchi H y col. (1996). The whole structure of the 13-subunit oxidized cytochrome c oxidase at 2.8 Å. *Science* 272:1136–1144.
- 135-Ursing BM, Slack KE y Arnason U. Subordinal artiodactyl relationships in the light of phylogenetic analysis of 12 mitochondrial protein-coding genes. (2000). *Zool. Scr.* 29. 83-88
- 136-Ursing BM, y Arnason U (1998) The complete mitochondrial DNA sequence of pig (*Sus scrofa*) *Mol. Biol. Evol* 47,302-306
- 137-Ursing BM, Arnason U. (1998) Analyses of mitochondrial genomes strongly support a hippopotamus-whale clade. *Proc Biol Sci.* 265 (1412):2251-5
- 130-Vidal-Rioja L, Semorile L, Bianchi NO, Padrón J (1987) DNA composition in South American camelids.I.Characterization and in situ hybridization of satellite DNA fractions. *Genetica* 72:137-146

- 139-Vidal-Rioja L, Zambelli A Semorile L (1994) An assessment of the relationships among species of Camelidae by satellite DNA comparisons. *Hereditas* 121:283-290
- 140-Vijayasathary C, Damle S, Prabu SK, Otto CM, Avadhani NG (2003) Adaptive changes in the expression of nuclear and mitochondrial encoded subunits of cytochrome c oxidase and the catalytic activity during hypoxia. *Eur J Biochem.* 270 (5):871-9
- 142-Wainio W (1955) Reaction of cytochrome c oxidase *J Biol Chem* 212 723-733
- 142-Wallace DC, Singh G, Lott MT, Hodge JA, SchurrTG, Lezza AMS, Elsas L.J.y Nikoskelainen,E.K. (1988) Mitochondrial DNA mutation associated with Leber's hereditary optic neuropathy. *Science* **242**, 1427-1430.
- 143 -Wallace DC Mitochondrial diseases in man and mouse. *Science*, 283:482-488, 1999.
- 144-Walker J,y Dickson V.(2006) The peripheral stalk of the mitochondrial ATP synthase. *Biochimica et Biophysica Acta* 1757 286-29
- 145-Webb S. (1974) Pleistocene Llamas of Florida, with a brief review of the Lamini. En *Pleistocene mammals of Florida* (Ed. S. Webb), pág. 170-214. Gainesville: University Press of Florida.
- 146-Weber (1928) *Die Saugetiere*.Jena. En: Wheeler (1994)
- Wheeler JC (1982) Aging Llamas and Alpacas by their teeth. *Llama World* 1(2), 12-17.
- 147-Wheeler J en *Avances y perspectivas del conocimiento de los camélidos sudamericanos*.Capítulo 1 pág. 12-48, S. Fernández-Vaca editor, Santiago de Chile 1991.
- 148-Wheeler JC (2003) Evolution and Origin of the Domestic Camelids. *ILR Report* Vol. 8 Issue #2.
- 149-Wing ES (1986) Domestication of Andean mammals. En: Vuilleumier F & M Monasterio (eds) *High altitude biogeography*: 246-264. Oxford University Press, Oxford, United Kingdom.
- 150-Wu W, Goodman M, Lomax M,Grossman L (1997) Molecular evolution of cytochrome c oxidasa subunit IV : evidence of positive selection in simian primates. *J.Mol.Evol.* 44,477-491
- 151- Yang Z (1997) PAML: A program package for phylogenetic analysis by maximum likelihood. *Comput Appl Biosci* 13: 555-556.

152-Xu S-Q, Yang YZ, Zhou J, Jin GE, Chen YT, Wang J, Yang HM, Wang J, Yu J, Zheng XG. y Ge RL. (2005) A mitochondrial genome sequence of the tibetan antelope (*Pantholops hodgsonii*) *Geno.Prot.Bioinfo* 3 (1) 5-17

153-Xu X y Arnason U (1994). The complete mitochondrial DNA sequence of the horse, *Equus caballus*: extensive heteroplasmy of the control region. *Gene* 148,357-362

154-Zhang W,Tsuchiya T, Yasukochi Y (1999) Transitional change in interaction between HIF-1 and HNF-4 in response to hypoxia .*Journal of Human Genetics* 44,293-309

155-Zhang J (2000) Rates of conservative and radical nonsynonymous nucleotide substitutions in mammalian nuclear genes .*JMol.Evol* 50,56-68

156-Zhang D-X, Hewitt GM (1996) Nuclear integrations: challenges for mitochondrial DNA markers. *Trends Ecol Evol* 11:247-251

## **Material suplementario**

**Anexo I.**

**Secuencia de los genomas mitocondriales del guanaco y la vicuña**

La línea inferior representa la secuencia consenso entre ambas

guanaco : GTTAATGTAGCTTAACTAAAAGCAAGGCGCTGAAAATGCCTAGATGGGCTCACGGCCCCATAAACACACAGGTTTGATCCC : 82  
 vicuña : GTTAATGTAGCTTAACTAAAAGCAGGGCGCTGAAAATGCCTAGATGGGCTCACGGCCCCATAAACACACAGGTTTGATCCC : 82  
 GTTAATGTAGCTTAAC TAAAAGCA GCGCTGAAAATGCCTAGATGGGCTCACGGCCCCATAAACACACAGGTTTGATCCC

guanaco : AGCCTTCTATTAGTTTCTGATAAATTTACACATGCAAGTATCCGCATCCAGTGAGAATGCCCCCTAAGTCTAGTTGAAC : 164  
 vicuña : AGCCTTCTATTAGTTTCTAATAAATTTACACATGCAAGTATCCGCACCCCACTGAGAATGCCCCCTAAGTCTAGTTGAAC : 164  
 AGCCTTCTATTAGTTTCT ATAAATTTACACATGCAAGTATCCGCA CCCAGTGAGAATGCCCCCTAAGTCTAGTTGAAC

guanaco : AGAAGGAGCGGGCATCAAGCACACAACCCCTGTAGCTAACGACGCTTGCTTGGCCACACCCCCACGGGATACAGCAGTGACA : 246  
 vicuña : AGAAGGAGCGGGCATCAAGCACACAACCCCTGTAGCTAACGACGCTTGCTTGGCCACGCCCCACGGGATACAGCAGTGACA : 246  
 AGAAGGAGCGGGCATCAAGCACACAACCCCTGTAGCTAACGACGCTTGCTTGGCCAC CCCCCACGGGATACAGCAGTGACA

guanaco : AAAATTAAGTTATAAACGAAAGTTGACTAAGTTATATTAAGGGTTGGTAAATTTCTGTCGCCGCCACCCGGGTGATAC : 328  
 vicuña : AGAATTAAGTTATAAACGAAAGTTGACTAAGTTATATTAAGGGTTGGTAAATTTCTGTCGCCGCCACCCGGGTGATAC : 328  
 A AATTAAGTTATAAACGAAAGTTGACTAAGTTATATTAAGGGTTGGTAAATTTCTGTCGCCGCCACCCGGGTGATAC

guanaco : GATTAACCCGAATTAATAGAAACCCGGCGTAAAGCGTGTTAACGAGAGACTAGTAATAGAGTTAAGCCCTGGCCAAGATGT : 410  
 vicuña : GATTAACCCGAATTAATAGAAACCCGGCGTAAAGCGTGTTAACGAGTAACTAGTAATAGAGTTAAGCCCTGACCAAGATGT : 410  
 GATTAACCCGAATTAATAGAAACCCGGCGTAAAGCGTGTTAACGAG ACTAGTAATAGAGTTAAGCCCTG CCAAGATGT

guanaco : AAAAAGCTATGGCCAGCGTAAAAATAAACTACGAAAGTGACCCTAATGCAATCCACTACAGCAGCTAAGACTCAAAGTGG : 492  
 vicuña : AAAAAGCTATGGT CAGCGTAAAAATAAACTACGAAAGTGACCCTAATGCAATCCACTACAGCAGCTAAGACTCAAAGTGG : 492  
 AAAAAGCTATGG CAGCGTAAAAATAAACTACGAAAGTGACCCTAATGCAA CCACTACAGCAGCTAAGACTCAAAGTGG

guanaco : GATTAGATACCCCACTATGCTTAGCCCTAAATTTAAGTGATTACAATAACAAAATCGCTCGCCAGAGTACTACTAGCAACAG : 574  
 vicuña : GATTAGATACCCCACTATGCTTAGCCCTAAATTTAAGTGATTACAATAACAAAATCGCTCGCCAGAGTACTACTAGCAACAG : 574  
 GATTAGATACCCCACTATGCTTAGCCCTAAATTTAAGTGATTACAATAACAAAATCGCTCGCCAGAGTACTACTAGCAACAG

guanaco : CTTAAAACCTCAAAGGACTTGGCGGTGCTTCATACCCCC-TAGAGGAGCCTGTTCTATAATCGATACACCCCGATCAACCTTA : 655  
 vicuña : CTTAAAACCTCAAAGGACTTGGCGGTGCTTCATACCCCC TAGAGGAGCCTGTTCTATAATCGATA ACCCCGATCAACCTTA : 656  
 CTTAAAACCTCAAAGGACTTGGCGGTGCTTCATACCCCC TAGAGGAGCCTGTTCTATAATCGATA ACCCCGATCAACCTTA

guanaco : CCAGCCCTTGCTAATTCAGTCTATATACCGCCATCTCCAGCAAACCCCTATAGGGAACAAAAGTAAAGTCAACTATTTAAAC : 737  
 vicuña : CCAGCCCTTGCTAATTCAGTCTATATACCGCCATCTCCAGCAAACCCCTATAGGGAACAAAAGTAAAGTCAACTATTTAAAC : 738  
 CCA CCCTTGCTAATTCAGTCTATATACCGCCATCTCCAGCAAACCCCTATAGGGAACAAAAGTAAAGTCAACTATTTAAAC

guanaco : ATAAAAACGTTAGGTCAAGGTGTAACCAATGGGATGGGAAGAAATGGGCTACATTTTCTTATCCCAAGAAAATCTCAAACC : 819  
 vicuña : ATAAAAACGTTAGGTCAAGGTGTAACCAATGGGATGGGAAGAAATGGGCTACATTTTCTTATCCCAAGAAAATCTCAAACC : 820  
 ATAAAAACGTTAGGTCAAGGTGTAACCAATGGGATGGGAAGAAATGGGCTACATTTTCTTATCCCAAGAAAATCTCAAACC

guanaco : CTTACGAAAGCCCTATGAAACTAAGGGCCAAGGAGGATTTAGCAGTAAATTAAGAATAGAGTGCTTAATTGAAGTAGGCC : 901  
 vicuña : CTTACGAAAGCCCTATGAAATTAGGGACCAAGGAGGATTTAGTAGTAAATTAAGAATAGAGTGCTTAATTGAAGTAGGCC : 902  
 CTTACGAAAGCCCTATGAAA TA GG CCAAAGGAGGATTTAG AGTAAATTAAGAATAGAGTGCTTAATTGAAGTAGGCC

guanaco : ATGAGCACGCACACACCCCGCTCACCCCTCTCAAGTATAACAGACCCGTAAGCAAACATAACAAGTGTCAAATATACGAG : 983  
 vicuña : ATGAGCACGCACACACCCCGCTCACCCCTCTCAAGTATAACAGACCCGTAAGCAAATATAACAAGTGTCAAATATATGAG : 984  
 ATGAGCACGCACACACCCCGCTCACCCCTCTCAAGTATAAC G CCC TAAGCAA ATAACAAGTGTCAAATATA GAG

guanaco : AAGAGACAAGTCGTAACAAGGTAAAGCATACTGAAAAGTGTGCTTGGATAAAACAAAACGTAGCTTAAGAAAAGCACCTAGTTT : 1065  
 vicuña : AAGAGACAAGTCGTAACAAGGTAAAGCATACTGAAAAGTGTGCTTGGATAAAACAAAACGTAGCTTAAGAAAAGCACCTAGTTT : 1066  
 AAGAGACAAGTCGTAACAAGGTAAAGCATACTGAAAAGTGTGCTTGGATAAAACAAAACGTAGCTTAA AAAAGCACCTAGTTT

guanaco : ACACCTAGGAGATTTTATAAAAAATGAACGTGTTGAACTAAAGCTAGCCCAGAAACCCATATTTCAACTATTTTAAACTA : 1147  
 vicuña : ACACCTAGGAGATTTTATAAAAAATGAACGTGTTGAACTAAAGCTAGCCCAGAAACCCATATTTCAACTATTTTAAACCA : 1148  
 ACACCTAGGAGATTTTATAAAAAATGAACGTGTTGAACTAAAGCTAGCCCAGAAACCCATATTTCAACTATTTTAAAC A

guanaco : TTAACAAAACATTTATTACTCTTTCAAAGTATAGGAGATAGAAATTTATTTATGGCGCTATAGAGAGAGTACCGTAAGG : 1229  
 vicuña : TTAACAAAACATTTATTACTCTTTTAAAGTATAGGAGATAGAAATTTATTTATGGCGCTATAGAGAGAGTACCGTAAGG : 1230  
 TTAACAAAACATTTATT ACTCTTT AAAGTATAGGAGATAGAAATTTATTTATGGCGCTATAGAGAGAGTACCGTAAGG

guanaco : GAACGATGAAAGAATACCTAAAAGTAATAAAAAGCAAAGATTAACCCCTTGACCTTTGCATAATGATTTAACTAGAAAATT : 1311  
 vicuña : GAACGATGAAAGAACACCTAAAAGTAATAAAAAGCAAAGATTAGCCCTTGACCTTTGCATAATGATTTAACTAGAAAATT : 1312  
 GAACGATGAAAGAA ACCTAAAAGTAATAAAAAGCAAAGATTA CCCTTGACCTTTGCATAATGATTTAACTAGAAAATT

guanaco : TTAGCAAAGAGAACTTAAGTTAAATACCCCGAAACCAGACGAGCTACTTGTAACAGCCTACGGAGCGAACTCGTCTATGTG : 1393  
 vicuña : TTAGCAAAGAGAACTTAAGTTAAATACCCCGAAACCAGACGAGCTACTTGTAACAGCCTACGGAGCGAACTCGTCTATGTG : 1394  
 TTAGCAAAGAGAACTTAAGTTAAATACCCCGAAACCAGACGAGCTACTTGTAACAGCCTACGGAGCGAACTCGTCTATGTG

guanaco : GCAAAATAGTGAGAAGATTTGCAAGTAGAGGTGACAAGCCTAACGAGCCTGGTGATAGCTGGTTGTCAGGAAAAGAAATGTA : 1475  
 vicuña : GCAAAATAGTGAGAAGATTTGCAAGTAGAGGTGACAAGCCTAACGAGCCTGGTGATAGCTGGTTGTCAGGAAAAGAAATGTA : 1476  
 GCAAAATAGTGAGAAGATTTGCAAGTAGAGGTGACAAGCCTAACGAGCCTGGTGATAGCTGGTTGTCAGGAAAAGAAATGTA

guanaco : AGTTCAACTTTAAAAATACCTAAAAACCGCTAATTTAATGTATTTTAAAAGCTAGTCTAAAAGGGTACAGCTTTTTAGA : 1557  
 vicuña : AGTTCAACTTTAAAAATACCTAAAAACCGCTAATTTAATGTATTTTAAAAGCTAGTCTAAAAGGGTACAGCTTTTTAGA : 1558  
 AGTTCAACTTTAAAAATACCTAAAAACCGCTAATTTAATGTATTTTAAAAGCTAGTCTAAAAGGGTACAGCTTTTTAGA

guanaco : CCGAGGATACAACCTTACTTAGAGAGTAAAAACAACCAACCCATAGTTGGCTTAAAAGCAGCCATCAATTAAAGAAAGCGTT : 1639  
 vicuña : CCGAGGATACAGCCTTACTTAGAGAGTAAAAACAACCAATACCATAGTTGGCTTAAAAGCAGCCATCAATTAAAGAAAGCGTT : 1640  
 CCGAGGATACA CCTTACTTAGAGAGTAAAAACAACCA ACCATAGTTGGCTTAAAAGCAGCCATCAATTAAAGAAAGCGTT

guanaco : CAAGCTCAACATTAACAGAGTTTAAATCCAATAGTCAACAAGGAACCTCAACCAATACTGGACTAATCTATTAATTA : 1721  
 vicuña : CAAGCTCAACATTAACAGAAATTTAATCCAATTAACAACAAGGAACCTCAATCAATACTGGACTAATCTATTAATTA : 1722  
 CAAGCTCAACATT AACA A TTTAATCCAATA TCAACAAGGAACCTCA CCAATACTGGACTAATCTATTAATTA

guanaco : TAGAAGCAATAATGTTAATATGAGTAAACAAGAAATATTTCCCTGCATAAGCTTATGTCAGCAACGGATATCTACTGACA : 1803  
 vicuña : TAGAAGCAATAATGTTAATATGAGTAAACAAGAAATATTTCCCTGCATAAGCTTATGTCAGCAACGGATATCTACTGACA : 1804  
 TAGAAGCAATAATGTTAATATGAGTAAACAAGAAATATTTCCCTGCATAAGCTTATGTCAGCAACGGATATCTACTGACA

guanaco : GTTAACACTTAAATAAATCTAACCCACCAATGAACAATTTAATAATTTACTGTTAACCCAACACAGGCATGCATTAAGGAAA : 1885  
 vicuña : GTTAACACTTAAATAAATCTAACCCACCAATGAACAATTTAATAAATTTACTGTTAACCCAACACAGGCATGCATTAAGGAAA : 1886  
 GTTAACACTTAAATAAATCTAACCCACCAATGAACAATTTAATAA T ACTGTTAACCCAACACAGGCATGCATTAAGGAAA

guanaco : GATTAAGAAGCAAAAAGGAACCTCGGCAACACGAGCCCGCCTGTTACCAAAAACATCACCTCTAGCATTACTAGTATTA : 1967  
 vicuña : GATTAAGAAGCAAAAAGGAACCTCGGCAACACGAGCCCGCCTGTTACCAAAAACATCACCTCTAGCATTACTAGTATTA : 1968  
 GATTAAGAAGCAAAAAGGAACCTCGGCAACACGAGCCCGCCTGTTACCAAAAACATCACCTCTAGCATTACTAGTATTA

guanaco : GAGGCACTGCCTGCCAGTACATTAAGTTAAACGGCCGCGGTATCCTGACCGTGCAAAGGTAGCATAATCATTGTTCTCTA : 2049  
 vicuña : GAGGCACTGCCTGCCAGTACACTCGTTAAACGGCCGCGGTATCCTGACCGTGCAAAGGTAGCATAATCATTGTTCTCTA : 2050  
 GAGGCACTGCCTGCCAGTGACA T GTTAAACGGCCGCGGTATCCTGACCGTGCAAAGGTAGCATAATCATTGTTCTCTA

guanaco : AATAAGGACTTGTATGAATGGCCACACGAGGGTTCTACTGTCTCTTGTCCCAATCAGTAAAATTGACCTCCCGTGCAGAG : 2131  
 vicuña : AATAGGACTTGTATGAATGGCCACACGAGGGTTCTACTGTCTCTTGTCCCAATCAGTAAAATTGACCTCCCGTGCAGAG : 2132  
 AATA GGACTTGTATGAATGGCCACACGAGGGTTCTACTGTCTCTTGTCCCAATCAGTAAAATTGACCTCCCGTGCAGAG

guanaco : GCGGGGATGAACAAATAAGACGAGAAGACCCCTATGGAGCTTCAATTAACCTAGCCAAAAGAAAATACAATTAACCACCAAGGG : 2213  
 vicuña : GCGGGGATGAGCAAAATAAGACGAGAAGACCCCTATGGAGCTTCAATTAACCTAGCCAAAAGAAAATACAATTAACCACCAAGGG : 2214  
 GCGGGGATGA CAAATAAGACGAGAAGACCCCTATGGAGCTTCAATTAACCTAGCCAAA AAAATACA TTAACCACCAAGGG

guanaco : ATAACAACACTCTACCTGGGCTGACAATTTGCGTTGGGGTGACCTCGGAGAACAGAAAACCTCCGAGTGACTAAAATTTAG : 2295  
 vicuña : ATAACAACACTCTACCTGGGCTAACAATTTGCGTTGGGGTGACCTCGGAGAACAGAAAACCTCCGAGTGACTAAAATTTAG : 2296  
 ATAACAACACTCTACCTGGGCT ACAATTTGCGTTGGGGTGACCTCGGAGAACAGAAAACCTCCGAGTGACTAAAATTTAG

guanaco : ATCTGCCGATCAAAATGTAGTGTCTTTATGATCCAAAAGTTATTTGATCAACGGAACAAGTTACCTAGGGATAACAGCGC : 2377  
 vicuña : ATCTGCCGATCAAAATGTAGTGTCTTTATGATCCAAAATTTATTTGATCAACGGAACAAGTTACCTAGGGATAACAGCGC : 2378  
 ATCTGCCGATCAAAATGTAGTGTCA TTATTTGATCCAAA TTATTTGATCAACGGAACAAGTTACCTAGGGATAACAGCGC

guanaco : AATCCTATTCAAGAGTCCATATCGACAATAGGGTTTACGACCTCGATGTTGGATCAGGACATCCCAATGGTGCAGCCGCTAT : 2459  
 vicuña : AATCCTATTCAAGAGTCCATATCGACAATAGGGTTTACGACCTCGATGTTGGATCAGGACATCCCAATGGTGCAGCCGCTAT : 2460  
 AATCCTATTCAAGAGTCCATATCGACAATAGGGTTTACGACCTCGATGTTGGATCAGGACATCCCAATGGTGCAGCCGCTAT

guanaco : TAAAGGTTGTTTTGTTCAACGATTAAAGTCTACGTGATCTGAGTTCAGACCGGAGCAATCCAGGTCGGTTTTCTATCTATTT : 2541  
 vicuña : TAAAGGTTGTTTTGTTCAACGATTAAAGTCTACGTGATCTGAGTTCAGACCGGAGCAATCCAGGTCGGTTTTCTATCTATTT : 2541  
 TAAAGGTTGTTTTGTTCAACGATTAAAGTCTACGTGATCTGAGTTCAGACCGGAGCAATCCAGGTCGGTTTTCTATCTATTT

guanaco : GTCAATTTCTCCAGTACGAAAGGACAAGAGAAATAAGGCCTACCCGACGAGGCGCTTAGAGCTAATTAATGATATAATC : 2623  
 vicuña : ATTAATTTCTCCTAGTACGAAAGGACAAGAGAAATAAGGCCTACCCGACGAGGCGCTTAGAACCATTAATGATATAATC : 2623  
 T AATTTCTCC AGTACGAAAGGACAAGAGAAATAAGGCCTACCC GCAGG GCGCCTTAGA C AATTAATGATATAATC

guanaco : TTAACCTAACCTAGTTCAAAAAAACACAGCCCTAGACCAGGGCTTGTTAGGGTGGCAGAGACCGGTAATGCATAAAAACTTAA : 2705  
 vicuña : TTAACCTAACCTAGTTCAAAAAAACACAGCCCTAGACCAGGGTTGTTAGGGTGGCAGAGACCGGTAATGCATAAAAACTTAA : 2705  
 TTAACCTAACCTAGTTCAAAAAAACACAGCCCTAGACCAGGG TTGTTAGGGTGGCAGAGACCGGTAATGCATAAAAACTTAA

guanaco : GATTTTACACCCAGAGGTTCAATTCCTCTCCCTAACATACATGTTTCATAATTAATATCCTTACACTTATTGTCCTATCCTC : 2787  
 vicuña : GACTTTACACCCAGAGGTTCAACTCCCTCTCCCTAACATACATGTTTCATAATTAATATCCTTACGCTCATTGTTCCATCCTC : 2787  
 GA TTTACACCCAGAGGTTCAA TCCTCTCCCTAACATACATGTTTCATAATTAATATCCTTAC CT ATTGT CC ATCCTC

guanaco : TTAGCAGTAGCATTCTCACCCCTAGTAGAACGAAAGTCCCTAGGCTATATACAACCTCCGAAAAGGCCCTAATGTCGAGGAC : 2869  
 vicuña : TTAGCAGTAGCATTCTCACCCCTAGTAGAACGAAAGTCCCTAGGCTATATACAACCTCCGAAAAGGCCCTAATGTCGAGGAC : 2869  
 TTAGCAGTAGCATTCTCACCCCTAGTAGAACG AAGTCCCTAGGCTATATACAACCTCCGAAAAGGCCCTAATGT GTAGGAC

guanaco : CCTACGGTCTACTACAACCAATGCGGACGCTATCAAAATATTACTAAAGAACCCTACGCCCGCCACCTCTCTATCAC : 2951  
 vicuña : CCTACGGTCTACTACAACCAATGCGAGATGCCATCAAACCTATTACTAAAGAACCCTACGCCCGCCACCTCTCTATCAC : 2951  
 CCTACGGTCTACTACAACCAATGCG GA GC ATCAA TATTACTAAAGAACC CTACGCCCGCCAC TCTCTATCAC

guanaco : CATATTCATCCTCGCCCCCTCCTAGCTCTAACTCTAGCTCTAACCATATGGATCCCCCTCCCAATGCCACAGCCCCTTGTT : 3033  
 vicuña : CATATTCATCCTCGCCCCCTCCTAGCTCTAACTCTAGCTCTAACCATATGAATCCCCCTCCCAATGCCACAGCCCCTTGTT : 3033  
 CATATTCAT CT GCCCCATCCTAGCTCTAACTCTAGCTCTAACCATATG ATCCCCCTCCCAAT CCACAGCCCCTTGTT

guanaco : GACATAAACCTAGGTGTACTATTATATACTAGCTATGTCAGCTTAGCTGTCTACTCTATTCTATGATCTGGCTGAGCCTCCA : 3115  
 vicuña : GACATAAACCTAGGTGTATTATTATATACTAGCTATATCTAGCTTAGCTGTCTACTCTATCCTATGATCTGGCTGAGCCTCCA : 3115  
 GACATAAACCTAGGTGTA TATTATATACTAGCTAT TC AGCTTAGCTGTCTACTCTAT CTATGATCTGGCTGAGCCTCCA

guanaco : ATTCAAATATGCACTAATTTGGTGCTCTCCGAGCTGTGCTCAAACCTATCTCATATGAAGTTACACTAGCCATTATTCTACT : 3197  
 vicuña : ACTCAAATATGCACTAATTTGGTGCTCTCCGAGCCTCGCCAGACTATCTCGTATGAAGTTACACTAGCTATTATTCTACT : 3197  
 A TCAAATATGCACTAATTTGGTGCTCTCCGAGC GT GC CA ACTATCTC TATGAAGTTACACTAGC ATTATTCTACT

guanaco : CTCGGTACTTCTAATAAATGGATCCTTTACTCTTTCAACACTCATCACACACAAGGCATATGAATAAATTATCCCAGCC : 3279  
 vicuña : CTCGGTACTTCTAATAAATGGGTCCTTTACTCTTTTCAACACTCATCACACACAAGGCATATGAATAAATTATCCCAGCC : 3279  
 CTCGGTACTTCTAATAAATGG TCCTTTACTCTTTT ACACTCAT ACAAC CA GA CATATATGAATAAATTATCCC GCC

guanaco : TGACCTTAGCCATAATATGATTTATCTCCACACTAGCTGAAACCAATCGGGCCCCATTTGACCTTACCGAAGGGGAATCAG : 3361  
 vicuña : TGACCTTAGCCATAATATGATTTATCTCCACACTAGCCGAAACCAACCGAGCCCATTTGACCTAACCAGGGGAGAGTCCG : 3361  
 TGACCTTAGCCATAATATGATTTATCTCCACACTAGC GAAACCAA CG GCCCATTGACCT ACCGA GG GA TC G

guanaco : AATAGTATCGGGCTTAAACGTAGAATATGCAGCTGGCCCTTTGCGCATATTTTTATAGCAGAATACGCTAACATTATTAT : 3443  
 vicuña : AACTAGTATCAGGCTTAAACGTAGAATATGCAGCTGGCCCTTTGCGCATATTTTTATAGCAGAATACGCTAACATCATTTAT : 3443  
 AA TAGTATC GGCTTAAACGTAGAATATGCAGCTGGCCCTTTCGC ATATTTTTATAGCAGAATACGCTAACAT ATTAT

guanaco : AATAAATGCTTTTACAACCTATTTTATCTTGGAGCCTTTTATAATCCCTATATACCAGAACTATACACAGCTAACTTTGTC : 3525  
 vicuña : AATAAATGCTTTTACAACCTATTTTATCTTGGAGCCTTTTATAATCCCTATATACCAGAACTATACACAGCTAACTTTGTC : 3525  
 AATAAATGCTTTTACAAC ATTTT TT TTCGGAGCCTTTTATAATCCCTATATACCAGAACTATACACAGCTAACTTTGTC

guanaco : CTTAAGACGCTACTATTAACCGTAACTTTCTATGAATCCGAGCATCCTACCCCGATTTCGATATGATCAACTAATACACC : 3607  
 vicuña : CTTAAGACGCTACTATTAACCGTAACTTTCTATGAATCCGAGCATCCTACCCCGATTTCGATATGATCAACTAATACACC : 3607  
 CTTAA ACGCTACTATTAACCGTAACTT CTATGAATCCGAGCATCCTACCCCGATTTCGATA GATCAACTAATACACC

guanaco : TACTATGAAAAAATTTTCTCCCCCTAACCTTAGCCCTATGCATATGACATGTCTCATTACCCATCTCAACAGCAGGTATTC : 3689  
 vicuña : TACTATGAAAAAATTTTCTCCCCCTAACCTTAGCCCTATGCATATGACATGTCTCATTACCCATCTCAACAGCAGGAATTC : 3689  
 TACTATGAAAAA TTTCT CCCT ACCTTAGCCCTATGCATATGACATGTCTCATT CC ATCTCAACAGCAGG ATTC

guanaco : GCCCAACATAAAGAAATATGCTGACAAAAGAATTACTTTGATAGAGTAAATAATAGAGGTTAAGCCCTCTATTCTTAG : 3771  
 vicuña : GCCCAACATAAAGAAATATGCTGACAAAAGAATTACTTTGATAGAGTAAATAATAGAGGTTAAGCCCTCTATTCTTAG : 3771  
 GCCCAACATAAAGAAATATGCTGACAAAAGAATTACTTTGATAGAGTAAATAATAGAGGTTAAGCCCTCTATTCTTAG

guanaco : AACTGCAGGAGTTGAACCTACCCCTAAGAATTCAAATTTCTTCGTGCTACCACACTACCCATATCTATAGTAAGGTGAGC : 3853  
 vicuña : AACTGCAGGAGTTGAACCTACCCCTAAGAATTCAAATTTCTTCGTGCTACCACACTACCCATATCTATAGTAAGGTGAGC : 3853  
 AACTGCAGGAGTTGAACCT CCCCTAAGAATTCAAATTTCTTCGTGCTACCACACTACCCATAT CTATAGTAAGGTGAGC

guanaco : TAAATAAGCTATCGGGCCATACCCCGAAAATGTTGGTTTATACCCCTCCCGTACTAATAAATCCCCTAATCTTTAGCATT : 3935  
 vicuña : TAAATAAGCTATCGGGCCATACCCCGAAAATGTTGGTTTATACCCCTCCCGTACTAATAAATCCCCTAATCTTTAGTATTA : 3935  
 TAAATAAGCTATCGGGCCATACCCCGAAAATGTTGGTTTATACCCCTCCCGTACTAATAAATCCCCTAATCTTTAG ATTA

guanaco : TCTTACTCACAATFATAGCAGGAACTTTAATTTGTATAATTAGCTCTCACTGATTATTTATCTGAATTGGCTTCGAAATAAA : 4017  
 vicuña : TCTTACTCAGAGTTATAGCAGGAACTTTAATTTGTATAATTAGCTCTCACTGATTATTTATCTGAATTGGCTTCGAAATAAA : 4017  
 TCTTACTCACA TTATAGCAGGAACTTTAATTTGTATAATTAGCTCTCACTGATTATTTATCTGAATTGGCTT GAAATAAA

guanaco : CATGCTTGCCATCATTCAGTCCCTAATAAAAAATTTAGCCCCGATCCATAGAGCCTCCACTAAGTATTTCTTACCCAA : 4099  
 vicuña : CATGCTTGCCATCATTCAGTCCCTAATAAAAAATTTAGCCCCGATCCATAGAGCCTCCACTAAGTATTTCTTACCCAA : 4099  
 CATGCTTGCCATCATTTCCA TCCTAATAAAAA TTAGCCCCGATCCATAGAGCCTCCACTAAGTA TTCCT ACCCAA

guanaco : GCTACCGCTCAATACTACTCATATTAGGAGTAATTTAACTTACTATATTCAGGTCATGAAGTACCACAAAAATCTTCA : 4181  
 vicuña : GCTACCGCTCAATACTACTCATGCTAGGAGTAATTTAACTTACTATATTCAGGTCATGAAGTACCACAAAAATCTTCA : 4181  
 GCTACCGC TCAATACTACTCAT TAGGAGTAATTTAACTTATAATTCAGGTCATGAAGTACCACAAAAATCTTCA

guanaco : ACCAAACCTCATCCATCATAATCACTACCGCCCTAACATAAAACTGGGGCTGGCCCATTCCTGAGTACCAGAAGT : 4263  
 vicuña : ACCAGACCTCATCCATCATAATCACTACCGCCCTAACATAAAACTGGGGCTAGCCCATTCCTGAGTACCAGAAGT : 4263  
 ACCA ACCTCATCCATCATAATCACTACCGC CTAACATAAAACTGGG CT GCCCATTCCTGAGTACCAGAAGT

guanaco : CACACAAGGCATTCCTTAGCATCAGGACTGATCCTACTGACCTGACAAAAACTAGCCCCCTTTCTGTGCTCTACCAAAT : 4345  
 vicuña : CACACAAGGCATTCCTTAGCATCAGGACTGATCCTACTGACTGACAAAAACTAGCCCCCTTTCTGTGCTCTACCAAAT : 4345  
 CACACAAGGCAT CCCTTAGCATCAGGACTGATCCTACTGAC TGACAAAAACTAGCCCC CTTTC GTGCTCTACCAAAT

guanaco : GCCCATCCATTAACFCAACATACTATTAACFATATCTGTCTATCAATTATAATTGGAGGCTGAGGAGGGCTTAATCAA : 4427  
 vicuña : GCCCATCTATTAACFCAACATACTATTAACFATATCTATTTATCAATCATAATTGGAGGCTGAGGAGGACTTAATCAA : 4427  
 GCCCATC ATTAACFCAACATACTATTAACFATATCT T TATCAAT ATAATTGGAGGCTGAGGAGG CTTAATCAA

guanaco : CGCAACTACGAAAAATFATAGCTACTCATCAATTTGGGCACATAGGCTGAATAACCGCAGTATAGTCTATAACCCACTAT : 4509  
 vicuña : CACAACTACGAAAAATFATAGCTACTCATCAATTTGGGCACATAGGCTGAATAACCGCAGTATAGTCTACAGCCCCACTAT : 4509  
 C CAACTACGAAAAAT ATAGCTACTCATCAATTTGGGCACATAGGCTGAATAACCGCAGT ATAGTCTA A CCCCAC AT

guanaco : AACAGTACTGTACCTACTAATATATCTCGCAATAACAATCACAATATTTATACTATTTATAATCAACTCCACTACTACACTC : 4591  
 vicuña : AACAACTACTGTACCTACTAGTATATCTCACAATAACAATCACAATATTTATACTATTTATAATCAACTCCACTACTACACTC : 4591  
 AACA TACTGTACCTACTA TATATCTC CAATAACAATCACAATATTTATACTATTT ATAAT AA TCCAC ACTACTACTC

guanaco : CTTTCTCTATCACAACCTGAAACAAAACACCTGTCTATTAACAACATAATTTCTCACTGTTATAATGTCCATAGGAGGCTCC : 4673  
 vicuña : CTTTCTATATCACAACCTGAAACAAAACACCTGTCTATTAACAACATAATTTCTCACCGTTATAATGTCCATAGGAGGCTCC : 4673  
 CTTTCT TATCACAACCTGAAACAAAACACCTGTCTATTAACAACATAATTTCTCAC GTTATAATGTCCATAGGAGGCTCC

guanaco : CTCCCCTACTGGATTTGCACCCCAATGAATAATCATCCAAGAAATTAACAAAAATGACAGCATCATTTCTTCCAACATAAT : 4755  
 vicuña : CTCCCCTGTCTGGATTTGCACCCCAATGAATAATCATCCAAGAAATTAACAAAAATGACAGCATCATTTCTTCCAACATAAT : 4755  
 CTCCCCT TCTGGATTTGC CC AAATGAATAATCATCCAAGAAATTAACAAAAATGACAGCATCATTTCTTCCAACATAAT

guanaco : AGCCATAATAGCACTATTAACCTATACTTTTATATGCGACTAACATACTCCACAGCACTTACCATGTTCCCTCATCTAAT : 4837  
 vicuña : AGCCATAATAGCACTATTAACCTATACTTTTACATAAGCACTAACATACTCCACAGCACTTACCATATTCCTTCACTAAT : 4837  
 AGCCATAATAGCACTATTAACCTATACTTTTA AT CGACTAACATACTCCACAGCACTTACCAT TTCCC TCATCTAAT

guanaco : AACATAAAAAATAAATGACAGTTTAAAAACAAAACGAATACCATCGCTGCCAATFATAGTAGTCTATCCACTATAATAC : 4919  
 vicuña : AACATAAAAAATAAATGACAATTTAAAAACAAAACGAATACCATCGCTGCCAATFATAGTAGTCTATCCACTATAATAC : 4919  
 AACATAAAAAATAAATGACA TTTGAAAA ACAAACGAATACCATCGCT CCAATFATAGTAGT CTATC ACTATAATA

guanaco : TACCTCTCACCCCTATAATATCAGTACTATACTAGGAATTTAGGTTAACTAGACCAAGAGCCTTCAAAGCTCTAAGCAAGT : 5001  
 vicuña : TACCTTTAACCCCTATAATATCAGTACTATACTAGGAATTTAGGTTAAACAGACCAAGAGCCTTCAAAGCTCTAAGCAAGT : 5001  
 TACCT T ACCCCTATAATATCAGTACTATACTAGGAATTTAGGTTAAAC AGACCAAGAGCCTTCAAAGCTCTAAGCAAGT

guanaco : ACAAACTACTAATTCCTGCCTAATAAGGACTGCAAGACTCTATCCTACATCAATGAATGCAAATCAACTACTTTAATTAAG : 5083  
 vicuña : ACAAACTACTAATTCCTGTCTAATAAGGACTGCAAGACTCTATCCTACATCGATTGAATGCAAATCAACTACTTTAATTAAG : 5083  
 ACAAACTACTAATTCCTGT AATAAGG CTGCAAGACTCTATCCTACATC ATTGAATGCAAATCAACTACTTTAATTAAG



Material suplementario

guanaco : CTAAGCCCTTCCTAGATTGGTGGCCCTGTATCCCACGAAATTTAGTTAACAGCTAAATACCCCTAGTCAACTGGCTTCAATC : 5165  
 vicuña : CTAAGCCCTTCCTAGATTGGTGGCCCTGTATCCCACGAAATTTAGTTAACAGCTAAATACCCCTAGTCAACTGGCTTCAATC : 5164  
 CTAAGCCCTTCCTAGATTGGTGGCCCTGTATCCCACGAAATTTAGTTAACAGCTAAATACCCCTAGTCAACTGGCTTCAATC

guanaco : TACTTCTCCCGCCTGAGAAAAAAAAGGCGGGAGAGCCCGGCAGAGTTTGAAGCTGCTTCTTTGAACTTGAATTCAT : 5247  
 vicuña : TACTTCTCCCGCCTGAGAAAAAAAAGGCGGGAGAGCCCGGCAGAGTTTGAAGCTGCTTCTTTGAACTTGAATTCAT : 5246  
 TACTTCTCCCGCCTGAGAAAAAAAAGGCGGGAGAGCCCGGCAGAGTTTGAAGCTGCTTCTTTGAACTTGAATTCAT

guanaco : GTGTTAATCACCACAGGACTTGATAAGAAGAGGGTTGTACCTCTGTCTTTAGATTACAGTCTAATGCCTACTCGGCCATC : 5329  
 vicuña : GTGTTAATCACCACAGGACTTGATAAGAAGAGGGTTGTACCTCTGTCTTTAGATTACAGTCTAATGCCTACTCGGCCATC : 5328  
 GTGTTAATCACCACAGGACTTGATAAGAAGAGG TGTACCTCTGTCTTTAGATTACAGTCTAATGCCT CTCGCCATC

guanaco : TTACCTATGTTCTATAAACCGCTGATTATTTTCAACAACCACAAAGATATCGGTACCCTCTATCTGCTATTCGGCGCTTGGG : 5411  
 vicuña : TTACCTATGTTCTATAAACCGCTGATTATTTTCAACAACCACAAAGATATCGGTACCCTCTATCTGCTATTCGGCGCTTGGG : 5410  
 TTACCTATGTTCTATAAACCGCTGATTATTT TCAACAACCACAAAGATATCGGTACCCTCTATCTGCTATTCGGCGCTTGGG

guanaco : CTGGGATAGTAGAACAGGGCTAAGTCTATTAATTCGAGCCGAATTAGGACAGCCCGGAACACTACTCGGAGATGACCAAT : 5493  
 vicuña : CTGGGATAGTAGAACAGGGTTAAGCCTACTAATTCGAGCCGAATTAGGACAGCCCGGAACACTACTCGGAGATGATCAAT : 5492  
 CTGGGATAGTAGAACAGGG TAAG CTA TAATTCGAGCCGAATTAGGACAGCCCGGAACACTACTCGGAGATGA CAAAT

guanaco : CTCACACGTAGTTGTTACGGCCACGCATTTGTTATAATTTCTTTATAGTTATACCAATCATGATCGGAGGCTTCGGAAAT : 5575  
 vicuña : CTCACACGTAGTTGTTACGGCCACGCATTTGTTATAATTTCTTTATAGT CATACCAATCATGATGGGGGCTTCGGAAAT : 5574  
 CTCACAA GTAGTTGTTACGGCCACGCATTTGTTATAAT TTCTTTATAGT ATACCAATCATGAT GG GGCTTCGGAAAT

guanaco : TGACTAGTTCCCTTAATGATTGGCGCACCAGACATGGCATTCCCCCGTATGAACAACATGAGCTTCTGGCTGCTACCCCCCT : 5657  
 vicuña : TGACTGGTTCCTTAAATGATTGGCGCCACAGACATGGCATTCCCCCGTATGAACAACATGAGCTTCTGGCTGCTACCCCCCT : 5656  
 TGACT GTTCCCTTAAATGATTGGCG CACAGACATGGCATTCCCCCGTATGAACAACATGAGCTTCTGGCTGCTACCCCCCT

guanaco : CATTCTACTACTTCTAGCATCATCCATAGTTGAAGCTGGGGCAGGCACCTGGTTGAAGTGTACCTCCTTAGCCGGAAA : 5739  
 vicuña : CATTCTACTACTTCTAGCATCATCCATAGTTGAAGCCTGGGGCAGGCACCTGGTTGAAGTGTACCTCCTTAGCCGGAAA : 5738  
 CATTCTACTACTTCTAGCATCATCCATAGTTGAAGC GGGGCAGGCACCTGGTTGAAGTGTACCTCCT TAGCCGGAAA

guanaco : CCTGGCCATGCAGGTGCTTCTGTTGACCTAACTATTTCTCTTTACACCTAGCAGGAGTATCTTCAATCCTAGGGGCCATT : 5821  
 vicuña : CTTGGCTCATGCAGGTGCTTCTGTTGATCTAACTATTTCTCTTTACACCTAGCAGGAGTGTCTTCAATCCTAGGGGCCATT : 5820  
 C TGGC CATGCAGGTGCTTCTGTTGA CTAACCTATTTCTCTTTACACCTAGCAGGAGT TCTTCAATCCTAGGGGCCATT

guanaco : AATTTTACTACTATCATCAACATAAAACCACCCGCATATCCCAATATCAGACTCCCCTGTTGCTGATCCGTCTTAA : 5903  
 vicuña : AATTTTACTACTATCATCAACATAAAACCACCCGCATATCCCAATATCAAACCTCCCCTGTTGCTGATCCGTCTTAA : 5902  
 AATTT ATTACTACTAT AT AACATAAAACCACCCGCATATCCCAATATCA ACTCCC T TT GTCTGATCCGTCTTAA

guanaco : TCACCGCTGCTCTTACTGCTCTCCCTGCCAGTACTAGCAGCCGGTATTACTATACTACTAACAGATCGTAACCTFAAACAC : 5985  
 vicuña : TCACCGCTGCTCTTACTGCTCTCCCTGCCAGTACTAGCAGCCGGTATTACTATACTACTAACAGATCGTAATTTAAATAC : 5984  
 TCACCGCTGCTCTTACTGCT TCCCTGCCAGTACTAGCAGCCGGTATTACTATACTACT ACAGATCGTAA TTAAAC AC

guanaco : AACTTTCTTTGATCCTGCAGGAGGAGGAGACCCCATCTGTACCAACACCTATTCTGATTCTTCGGCCATCCAGAAGTCTAT : 6067  
 vicuña : AACTTTCTTTGATCCTGCAGGAGGAGGAGACCCCATCTGTATATCAACATCTATTCTGATTCTTCGGCCATCCAGAAGTCTAT : 6066  
 AACTTTCTTTGA CCTGCAGGAGG GGAGACCCCATCT TA CAACA CTATTCTGATTCTTCGGCCATCCAGAAGTCTAT

guanaco : ATTCTAATTTTACCAGGCTTTGGAATAATCTCCACATCGTCACTTACTACTCTGGAAAAAAGAACCCCTTCGGCTACATGG : 6149  
 vicuña : ATTCTAATCTTACCTGGCTTTGGAATAATCTCCCATATCGTCACTTACTACTCTGGAAAAAAGAACCCCTTCGGCTACATGG : 6148  
 ATTCTAAT TTACC GGCTTTGGAATAATCTCCCA ATCGTCACTTA TACTCTGGAAA AAAGAACCCTTCGGCTACATGG

guanaco : GAATAGTCTGAGCTATGATATCCATTGGCTTCTAGGCTTTATGTTGTGAGCCACCACATATTTACCCTAGGCTATAGACGT : 6231  
 vicuña : GAATGGTCTGAGCTATAATGCTCATTGGCTTCTAGGCTTTATGTTGTGAGCCACCACATATGTTACCCTAGGCTATAGACGT : 6230  
 GAAT GTCTGAGCTAT AT TCCATTGGCTTCTAGGCTTTATGTTGTGAGCCACCA AT TTTACCCTAGG ATAGACGT

guanaco : AGATACACGCGCTTATTTTACATCCGCCACAATAATCATTGCAATCCCAACGGGAGTAAAAGTATTTAGTTGACTAGCAACA : 6313  
 vicuña : AGATACACGCGCTTATTTTACATCCGCCACAATAATCATTGCAATCCCAACGGGAGTAAAAGTATTTAGTTGACTAGCAACA : 6312  
 AGATACACGCGCTTATTTTACATCCGCCACAATAATCATTGCAATCCCAACGGGAGTAAAAGTATTTAGTTGACTAGCAACA

guanaco : CTCCACGGAGGTAACATTAATGATCCCCCGCTATACTATGAGCTCTAGGCTTTATCTTCTGTTACCCTAGGAGGCTTAA : 6395  
 vicuña : CTCCACGGAGGTAATTAATGATCCCCCGCTATGCTATGAGCTCTAGGCTTTATTTCTCTGTTACCCTAGGAGGCTTAA : 6394  
 CTCCACGGAGGTAATTAATGATCCCCCGCTAT CTATGAGCTCTAGGCTTTAT TTCCTGTTACCCTAGGAGGCTTAA

guanaco : CAGGAATTGACTAGCCAATTCATCATTAGATATTGTTCTTCACGACACATATTATGTAGTTGCCCATTTCCACTATGTCTT : 6477  
 vicuña : CAGGAATTGACTAGCCAATTCATCATTAGATATTGTTCTTCACGATACGTATTATGTAGTTGCCCACTTCCACTACGTCTT : 6476  
 CAGGAATTGACTAGCCAATTCATCATTAGATATTGTTCTTCACGA AC TATTATGTAGTTGCCCA TTCCACTA GTCTT

guanaco : ATCAATGGGGCAGTATTTGCCATCATAGGAGGACTAATCCACTGATTCCCATTTATCTCGGGATATACTATTGATGATACA : 6559  
 vicuña : GTCATAGGGGCAGTATTTGCCATCATAGGAGGACTAATCCACTGATTCCCATTTATCTCAGGATATACTATTGATGACACA : 6558  
 TCAAT GGGGCAGTATTTGCCATCATAGGAGGACTAATCCACTGATTCCCATTTATCTC GGATATACTATTGATGA ACA

guanaco : TGGGCAAAAATTAGTTCGCAATTTATTTGTAGGCGTAAATCTAACTTTCTTCCCACAACACTTTTTAGGTCTCTCTGGAA : 6641  
 vicuña : TGGGCAAAAATTAGTTCGCAATTTATTTGTAGGCGTAAATCTAACTTTCTTCCCGCAACACTTTTTAGGTCTCTCTGGAA : 6640  
 TGGGCAAAAATTAGTTCGCAATTTATTTGTAGGCGTAAATCTAACTTTCTTCCC CAACA TTTTTAGGTCTCTCTGGAA

guanaco : TACCTCGACGCTACTCTGACTACCCAGATGCCTACACCACATGAAACACTATCTCATCTGTAGGCTCCTTCATCTCCTTAAC : 6723  
 vicuña : TACCTCGACGCTACTCTGACTACCCAGATGCCTACACCACATGAAATACATCTCATCTGTAGGCTCATTCTCCTTAAC : 6722  
 TACCTCGACGCTACTCTGACTACCCAGATGCCTACACCACATGAAA ACTATCTCATCTGTAGGCTC TTCATCTCCTTAAC

guanaco : AGCAGTCATACTAATGGTTTTATGTATGAGAGGCATTTGCATCAAAACGAGAAGTTATAACCGTAGAGCTAACAGCCACC : 6805  
 vicuña : AGCAGTTATACTAATGGTTTTATGTATGAGAGCATTTGCATCAAAACGAGAAGTTATAACCGTAGAGCTAACAGCCACC : 6804  
 AGCAGT AACTAATGGTTTT ATTTGTATGAGA GCATTTGCATCAAAACGAGAAGTTATAACCGTAGAGCTAACAGCCACC

guanaco : AATCTAGAGTACTGATGGATGTCGCCACCCTATCACACATTCGAAGAGCCAACCTACATTAACCTAAAATAGATAAGAA : 6887  
 vicuña : AACTTAGAGTGGCTGCACGGATGTCGCCACCCTATCACACATTCGAAGAGCCAACCTACATTAACCTAAAATAGATAAGAA : 6886  
 AA TAGAGTG CTGCA GGATGTCGCCACCCTATCACACATTCGAAGAGCCAACCTACATTAACCTAAAATAGATAAGAA

guanaco : AGGAAGGAATCGAACCTCTCTAATTTGGTTTCAAGCCAACCCCATAGCCACTATGACTTTCTCGATCTAGAGGTATTAGTAA : 6969  
 vicuña : AGGAAGGAATCGAACCTCTCTAATTTGGTTTCAAGCCAACCCCATAGCCACTATGACTTTCTCGATCTAGAGGTATTAGTAA : 6968  
 AGGAAGGAATCGAACCTCTCTAATTTGGTTTCAAGCCAACCCCATAGCCACTATGACTTTCTCGATCTAGAGGTATTAGTAA

guanaco : AACTTACATGACCTTGTCAAGGTTAAATTTAGGTGAAAACCTGTATACCTCTATGCCATACCCATTTCAACTAGGTTTTTC : 7051  
 vicuña : AATTTACATGGCCTTGTCAAGGCAAATTTAGGTGAAAACCTGTATACCTCTATGCCATACCCATTTCAACTAGGTTTTTC : 7050  
 AA TTACATG CCTTGTCAAG AAATTTAGGTGAAAACCT TATACCTCTATGCCATACCC TTTCAACTAGGTTTTTC

guanaco : AAGATGCTACATCCCCTATTATAGAAGGCTACTATACTTCCATGATCAGCCTTTAATAGTAGTATTTTTAATCAGTTCTCT : 7133  
 vicuña : AAGATGCCACATCCCCTATTATAGAAGGCTACTATACTTCCATGATCAGCCTTTAATAGTAGTATTTTTAATCAGTTCTCT : 7132  
 AAGATGC ACATCCCCTATTATAGAAGGCTACTATA TTCCATGA CAGCCTTTAATAGTAGT TTTTTAATCAGTTCTCT

guanaco : AGTATTATATATCATTACTCTGATGCTAACAATAAATTAACACACAGGACCATGGATGCCAAGAAGTCGAGACCATT : 7215  
 vicuña : AGTATTATATATCATTACTCTGATGCTAACAATAAATTAACACACAGGACCATGGATGCCAAGAAGTCGAGACCATT : 7214  
 AGTATTATATATCATTACTCTGAT TAACAATAAATTAACACACAGGACCATGGATGCCAAGAAGTCGAGACCATT

guanaco : TGAACCATCTTACCTGCGATCATTTCAATACAATCGCCCTCCCATCGCTACGAATCCTTTACATGATGGATGAAATCAATA : 7297  
 vicuña : TGAACCATCTTACCTGCTATTTCAATACAATCGCCCTCCCATCGCTACGAATCCTTTATATGATGGATGAAATCAATA : 7296  
 TGAACCATCTTACCTGC AT ATTTCAATACAATCGCCCT CCATC CT CGAATCCTTTA ATGATGGATGAAATCAATA

guanaco : ACCCAGTTCTAACCGTCAAAAACAATTTGGCCATCAATGGTACTGAAGCTATGAATATACTGATTATGAGGATCTCAGCTTCGA : 7379  
 vicuña : ACCCAGTTCTAACCGTCAAAAACAATTTGGCCATCAATGGTACTGAAGCTATGATATACTGATTATGAGGATCTCAGTTTCGA : 7378  
 ACCCAGTTCTAACCGTCAAAAACAATTTGG CATCAATGGTACTGAAGCTATGA TATACTGATTATGAGGATCTCAG TTCCGA

guanaco : CTCCTATATAATCCCAACATCAGACCTAAAACAGGTGAACACTACGCTACTGGAAGTGGACAACCGAGTCTGTTCTACCAATG : 7461  
 vicuña : CTCCTATATAATCCCAACATCAGACCTGAAACCAGGCGAGTTACGCTACTGGAGTAGACAATCGAGTCTGTTCTACCAATG : 7460  
 CTC TATATAATCCCAACATCAGACCT AAACCAGG GA TAGCCTACTGGA GT GACAA CGAGTCTGTTCTACCAATG

guanaco : GAAATAACTATCCGAATACTAGTTACCTCTGAAGATGTACTGCATCATGAGCAGTCCCTCCTTAGGAGTAAAAACAGACG : 7543  
 vicuña : GAAATAACTATCCGAATACTAGTTACCTCTGAAGATGTACTGCATCATGAGCAGTCCCTCCTTAGGAGTAAAAACAGACG : 7542  
 GAAATAACTATCCGAATACTAGTTACCTCTGAAGATGTACT CACTCATGAGCAGT CCCTCCTTAGGAGTAAAAACAGACG

guanaco : CAGTCCCTGGGCGCTAAATCAAGTTACACTAATGTCAACACAGCCTGGACTTTTCTATGGACAGTGTTCAGAAATTTGCGG : 7625  
 vicuña : CAGTCCCTGGGCGCTAAATCAAGTTACACTAATGTCTACACAGCCTGGACTTTTCTATGGACAGTGTTCAGAAATTTGCGG : 7624  
 CAGTCCCTGGGCGCTAAATCAAGTTACACTAATGTCAACACAGCCTGGACTTTTCTATGGACAGTGTTCAGAAATTTGCGG

guanaco : CTCAAATCATAGCTTTATGCCAATTTGCTCTTGAGATGGTACCCTAAAGTATTTTGGAGGATGATCTGCCTCTATATTATAA : 7707  
 vicuña : CTCAAATCATAGCTTTATGCCAATTTGCTCTTGAGATGGTACCCTAAAGTATTTTGGAGGATGATCTGCCTCTATATTATAA : 7706  
 CTCAAATCATAGCTTTATGCCAATTTGCTCTTGAGATGGT CCACTAAA TATTTGAGGA TGATCTGCCTCTATA TATAA

guanaco : GCTCACTAAGAAGCTAGTCAGCCTTAACCTTTTAAAGTTAAAGAACGAGAGCTATAAACCCCTCCTTAGTGACATGCCCAACT : 7789  
 vicuña : GCTCACTAAGAAGCTAGTCAGCCTTAACCTTTTAAAGTTAAAGAACGAGAGCCTAAGCCCTCCTTAGTGACATGCCCAACT : 7788  
 GCTCACTAAGAAGCTAGTCAGCCTTAACCTTTTAAAGTTAAAGAACGAGAGC ATAA CCCTCCTTAGTGACATGCCCA CT

guanaco : GGATACATCAACGTGATTTATCACAATTCTATCAATACTTATAACCTTATTCATCCTATTTCACCTAAAACCTCTCTAAACAC : 7871  
 vicuña : GGACACATCAACGTGATTTATCACAATTCTATCAATACTTATAACCTTATTCATCCTATTTCACCTAAAACCTCTCTAAACAC : 7870  
 GGA ACATCAACGTGATTTATCACAATTCTATCAATACTTATAACCTTATTCATCCT TTTCACTAAAACCTCTCTAAACAC

guanaco : ATCTACTATTCAACCCAGAGCCCAAAATTTAGTAAAAACACAAAGCAAACACCCCTGAGAAACGAAATGAACGAAAATTT : 7953  
 vicuña : ATCTACTATTCAACCCAGAGCCCAAAATTTAGTAAAAACGATAACCAAACACCCCTGAGAAACGAAATGAACGAAAATTT : 7952  
 ATCTACTATTCAAC CCAGAGCCCAAAATTTAGTAAAA CA AA CAAAACACCCCTGAGAAACGAAATGAACGAAAATTT

guanaco : ATTTGCCTCTTTTATTACCCCAACAATAATAGGACTTCTATTGTTACCCTTGTGTTATATTTCCCAAGTATATTTTCCA : 8035  
 vicuña : ATTTGCCTCTTTTATTACCCCAACAATAATAGGACTTCTATTGTTACCCTTGTGTTATATTTCCCAAGTATATTTTCCA : 8034  
 ATTTGCCTCTTTTATTACCCCAACAATAATAGGACTTCTATTGTTACCCTTGTGTTATATTTCCCAAGTATATTTTCCA

guanaco : ACTCCTGCCGACTAATTAATAACCGCTTAATCTCTTTCAACATTGGCTAATTCGACTCACATCTAAGCAAATAATAACTA : 8117  
 vicuña : ACTCCTGCCGACTAATTAATAACCGCTTAATCTCTTTCAACATTGGCTAATTCGACTCACATCTAAGCAAATAATAACTA : 8116  
 ACTCCTGCCGACTAATTAATAACCGCTTAATCTCTTTCAACATTGGCTAATTCGACTCACATCTAA CAAATAATAACTA

guanaco : TTCACAACACAAAGGACAGACCTGATCCTTAATGCTAATGTCTCTAATTTATTTATTTGGGGCTACTAACCTTCTAGGACT : 8199  
 vicuña : TTCACAACACAAAGGACAGACCTGATCCTTAATGCTAATGTCTCTAATTTATTTATTTGGGGCTACTAACCTTCTAGGACT : 8198  
 TTCACAAC ACAAGGACAGACCTGATCCTTAATGCTAATGTCTCTAATTTATTTATTTGGGGCTACTAACCTTCTAGGACT

guanaco : CCTTCCGACTCATTTACTCCTACCACACAGCTATCAATAAACCCTAGGCATGGCAGTTCCTCTATGAGCTGGGACTGTAGTC : 8281  
 vicuña : CCTTCCGACTCATTTACTCCTACCACACAGCTATCAATAAACCCTAGGCATGGCAGTTCCTCTATGAGCTGGGACTGTAGTC : 8280  
 CCTTCC CACTCATTTACTCCTACCACACAGCTATCAATAAACCCTAGGCATGGCAGTTCCTCTATG GCTGGGACTGTAGTC

guanaco : ACTGGCTTTTCGCAATAAAACGAAAGCATCACTAGCACACTTCTCCCCAAGGAACGCCACACCCTAATCCCCATATTAG : 8363  
 vicuña : ACTGGCTTTTCGCAATAAAACGAAAGCATCACTAGCGCCTTCTCCCCAAGGAACGCCACACCCTAATCCCCATATTAG : 8362  
 ACTGGCTTTTCGCAATAAAACGAAAGCATCACTAGC CACTTCTCCCCAAGGAACGCCACACCCTAATCCCCATATTAG

guanaco : TAATTATCGAGACTATCAGCCTGTTTCATTCAACCCGTGGCCCTGGCCGTTTCGACTAACAGCTAACATCACAGCAGGCCATTT : 8445  
 vicuña : TAATTATCGAACTATCAGCCTGTTTCATTCAACCCGTGGCCCTGGCCGTTTCGACTAACAGCTAACATCACAGCAGGCCATTT : 8444  
 TAATTATCGA ACTATCAGCCTGTTTCATTCAACCCGTGGCCCTGGCCGTTTCGACTAACAGCTAACATCACAGCAGGCCATTT

guanaco : ATTTGATACACTAATTTGGAGGGGCTACTCTAGCCTTAATAAACATCAGTACACTGACAGCCCTCCTTACTTTTGTGGTCTTA : 8527  
 vicuña : ATTTGATACACTAATTTGGAGGGGCTACTCTAGCCTTAATAAATATCAGTACACTGACAGCCCTCCTTACTTTTGTGGTCTTA : 8526  
 ATT AT CACCTAATTTGGAGGGGCTACTCTAGCCTTAATAA ATCAGTACACTGACAGCCCTCCTTACTTTTGTGGTCTTA

guanaco : GTTTTACTTACAATCCTCGAATTTGCCGTGGCTATAATCCAAGCCTATGTTTTTACCCTATTAGTAAGCTATACCTACATG : 8609  
 vicuña : GTTTTACTTACAATCCTCGAATTTGCCGTGGCTATAATCCAAGCCTATGTTTTTACCCTATTAGTAAGCTATACCTACATG : 8608  
 GTTTTACTTACAATCCTCGAATTTGCCGTGGCTATAATCCAAGCCTATGTTTTTACCCTA TAGTAAG CTATACCTACATG

guanaco : ACAATACTTAATGACCCACAGACCCACGCATACCACATAGTGAATCCTAGCCCTTGACCCCTTACAGGAGCCCTCTCAGCC : 8691  
 vicuña : ACAATACTTAATGACCCACAGACCCACGCATACCACATAGTGAATCCTAGCCCTTGACCCCTTACAGGAGCCCTCTCAGCC : 8690  
 ACAATACTTAATGACCCACAGACCCACGCATACCACATAGTGAATCCTAGCCCTTGACCCCTTACAGGAGCCCT CTAGCC

guanaco : CTTCTAATAACATCCGGCCTAATTTATGTGATTCCACTACAATTCAGCCCTCCTACTGTGCTAGGCTTAATTACAAATATGC : 8773  
 vicuña : CTTCTAATAACATCCGGCCTAATTTATGTGATTCCACTACAATTCAGCCCTCCTACTGTGCTAGGCTTAATTACAAATATGC : 8772  
 CTT TAATAACATCCGGCCTAATTTATGTGATTCCACTACAATTCAGCCCTCCTACTGTGCTAGGCTTAATTACAAATATGC

guanaco : TAACAATATATCAATGATGGCGAGACATTATTCGAGAGGACATTCCAAGGACACCACACCCCTCCGTCACAAAAGGTTT : 8855  
 vicuña : TAACAATATATCAATGATGGCGAGACATTATTCGAGAAAGGACATTCCAAGGACATCACACCCCTCCGTCACAAAAGGTTT : 8854  
 TAACAATATATCAATGATGGCGAGACATTATTCGAGA AGCACATTCCAAGGACA CACACCCCTCCGTCACAAAAGGTTT

guanaco : ACGATACGGAATAGTTCTATTTATCGTATCCGAGGCTCTATTTTTCAGTGGATTCTTTTGGAGCTTTCTACCATTCAAGCCTC : 8937  
 vicuña : ACGATACGGAATAGTTCTATTTATCGTATCCGAGGCTCTATTTTTCAGCAGGTTCTTTTGGAGCTTTCTACCATTCAAGCCTC : 8936  
 ACGATACGGAATAGTTCTATTTATCGTATC GA GTCCTATTTTTCAG GG TTTTGGAGCTTTCTACCATTCAAGCCTC

guanaco : GCCCCTACCCAGAACTAGGAGGGTGTGACCCCAACCGGAATCCACCCCTAAACCCGCTAGAAGTCCCCCTCTCTCAATA : 9019  
 vicuña : GCCCCTACCCAGAACTGGAGGGTGTGACCCCAACCGGAATCCACCCCTAAACCCGCTAGAAGTCCCCCTCTCTCAATA : 9018  
 GCCCCTACCCAGAACT GGAGGGTGTGACC CC ACCGGAAT CACCC CTAACCC CTAGAAGTCCC CTCTCTCAATA

guanaco : CCTCCGTTCTACTAGCCTCTGGAGTCTCAATTACCTGAGCCCACCACAGCTTAATAGAAGGAAATCGCACTCACATACTACA : 9101  
 vicuña : CCTCTGTTCTACTAGCCTCTGGAGTTTCAATTACCTGAGCTCACCACAGCTTAATAGAAGGAAATCGCACCACATATTACA : 9101  
 CCTC GTTCTACTAGCCTCTGGAGT TCAATTACCTGAGC CACCACAGCTTAATAGAAGG AATCGCAC CACATA TACA

guanaco : AGCCCTATTTATTACAATTGCTCTAGGATTATATTTACACTACTACAGGCTTCAGAGTACTACGAAGCACCTTTTACAATC : 9183  
 vicuña : AGCCCTATTTATTACAATTGCTCTAGGATTATATTTACACTACTGCAAGCTTCGGAACTACTACGAAGCACCTTTTACAATC : 9183  
 AGCCCTATTTATTACAATTGCTCTAGGATTATATTTACACTACT CA GCTTC GA TACTACGAAGCACCTTTTACAATC

guanaco : TCTGATAGTGTTCACGGCTCCACTTTTTTCGTAGCCACTGGCTTCCATGGCTTACATGTCATTATTGGCTCCACTTTCCCTG : 9265  
 vicuña : TCTGATAGTGTTCACGGCTCCACTTTTTTCGTAGCCACTGGCTTCCATGGCTTACATGTCATTATTGGCTCCACTTTCCCTG : 9265  
 TCTGATAGTGTTCACGGCTCCACTTTTTTCGTAGCCACTGGCTTCCATGGC TACATGTCATTATTGGCTCCACTTTCCCT G

guanaco : CTGCTGCTTTTTACGACAATTTAAAATTTCACTTTCACATCTAGCCACCCTCGGATTTGAGGCGCTGCTTGATATTGACA : 9347  
 vicuña : CTGCTGCTTTTTACGACAATTTAAAATTTCACTTTCACATCTAGCCACCCTCGGATTTGAGGCGCTGCTTGATATTGACA : 9347  
 CTGCTGCTTTTTACGACAATTTAAAATTT CACTTTCACATCTAGCCACCCTCGGATTTGA GC GCTGCTTGATATTGACA

guanaco : TTTCTGATAGTGTTCACGGCTCCACTTTTTTCGTAGCCACTGGCTTCCATGGCTTACATGTCATTATTGGCTCCACTTTCCCTG : 9429  
 vicuña : TTTCTGATAGTGTTCACGGCTCCACTTTTTTCGTAGCCACTGGCTTCCATGGCTTACATGTCATTATTGGCTCCACTTTCCCTG : 9429  
 TTTCTGATAGTGT GTGACTATTCCCTTTACG T C ATTTATTGATGAGGCTCCT TCCTTTTAGTATTATTAGTACAAC

guanaco : TGACTTCCAATCAGTTAGATTGGAGAGACCCGAAAAGGATAATCAATCTCCTACTGGCTCTACTTACAAACACTACCCTA : 9511  
 vicuña : TGACTTCCAATCAGTTAGATTGGAGAGACCCGAAAAGGATAATCAATCTCCTACTGGCTCTACTTACAAATATTACCCTA : 9511  
 TGACTTCCAATCAGTTAGATTGGAGAGA CCGAAAAGGATAATCAATCTCCTACTGGCTCTACTTACAAA A TACCCTA

guanaco : GCATCACTCCTCGTACTAATTGCATTTTGATTGCCCAATTTAAATGTTTACGAGAAAAACAAGTCTTATGAGTGTGGCT : 9593  
 vicuña : GCATCACTCCTCGTACTAATTGCATTTTGATTGCCCAATTTAAACGTTTACGAGAAAAACAAGTCTTATGAGTGTGGCT : 9593  
 GCATCACTCCTCGTACTAATTGCATTTTGATT CCCCATTAAA GTTTACGAGAAAAC AGTCCCTTATGA TGTGGCT

guanaco : TCGACCCCATAGGATCTGCCCGCTACCTTTTCCATAAAAATTTTTCTGATTGCTATTACATTTCTTATTGACCTAGA : 9675  
 vicuña : TCGACCCCATAGGATCTGCCCGCTACCTTTTCCATAAAAATTTTTCTGATTGCTATTACATTTCTTATTGACCTAGA : 9675  
 T GA CCCATAGGATC GCCCGC TACCTTT TCCATAAAAATTTTTCTGATTGCTATTACATTTCTTATTGACCTAGA

guanaco : AATTGCCCTCCTTACCCTTCCCTGGCAACCCAAACAAATCATCTACACACTATACTAATAGCCCTCCTTCTCATT : 9757  
 vicuña : AATTGCCCTCCTTACCCTTCCCTGGCAACCCAAACAAATTTTACACACTATACTAATCATAGCCCTCCTTCTCATT : 9757  
 AATTGCCCTCCT TACCCT CCCTG GCAACCCAAACAAAT AT TACACACTATACTAA ATAGCCCTCCTTCTCATT

guanaco : TCACTATTAGCAATTAGTCTCGCCTACGAGTGAACCTCAAAAAGGACTAGAATGAACCTGAATATGATAATTAGTTTAAATAAA : 9839  
 vicuña : TCACTATTAGCAATTAGTCTCGCCTACGAGTGAACCTCAAAAAGGACTAGAATGAACCTGAATATGATAATTAGTTTAAATAAA : 9839  
 TCACTATTAGCAATTAGTCTCGCCTACGAGTGAACCTCAAAAAGGACTAGAATGAACCTGAATATGATAATTAGTTTAAATAAA

guanaco : ATTAATGATTTGACTCATTAGATTATGATTAAGTTTATAAATATCAAATGTCATAGTATACATAAATATTATACTAGCAT : 9921  
 vicuña : ATTAATGATTTGACTCATTAGATTATGATTAAGTTTATAAATATCAAATGTCATAGTATACATAAATATTATACTAGCAT : 9921  
 ATTA TGATTTGACTCATTAGATTATGATTA TTAATAATATCAAATGTC ATAGT TACATAAATATTATACTAGCAT

guanaco : TTACTATATCCCTTATTGGCTCCTAATATACCGGTCTCACCTAATATCTTCTCTACTATGTCTAGAAGGCATAACTTTTC : 10003  
 vicuña : TTACTATATCCCTTATTGGCTCCTAATATACCGGTCCCTAATATACCGGTCCCTAATATCTTCTCTACTATGTCTAGAAGGCATAACTTTTC : 10003  
 TTACTATATCCCTTAT GGCTCCTAATATACCG TC CACCTAATATCTTCTCTACTATGTCTAGAAGG ATAAT CTTTC

guanaco : CCTTTTTGTAATAGCATCTCTAATAATTCTAAGTACCCACTTTACCCTAGCTAGCATGATACCTATCATCCTCCTAGTATTTC : 10085  
 vicuña : CCTTTTTGTAATAGCATCTCTAATAATTCTAAGTACCCACTTTACCCTAGCTAGCATGATACCTATCATCCTCCTAGTATTTC : 10085  
 CCTTTTTGTAATAGCATCTCTAATAATTCTAAGTACCCACTTTACCCTAGCTAGCATGATACCTATCATCCTCCTAGTATTTC

guanaco : GCGGCATGTGAGGCCGACTGGGTTTACGCTTACTAGTAAATATCTCAAATACGTATGGCACAGATTACGTACAAAACCTGA : 10167  
 vicuña : GCGGCATGTGAGGCCGACTGGGTTTACGCTTACTAGTAAATATCTCAAATACGTATGGCACAGATTACGTACAAAACCTGA : 10167  
 GCGGCATGTGAGGCCGACTGGGTTTACGCTTACTAGTAAATATCTCAAATAC TATGGCACAGA TA GTACAAAACCTGA

guanaco : ATCTCCTACAATGCTAAAAATTTATTTCCCTCCATCATACTAATCCCTGACCTGACTATCAAAAAATAGCATAAATCTGA : 10249  
 vicuña : ACCTCCTACAATGCTAAAAATTTATTTCCCTCCATCATACTAATCCCTGACCTGACTATCAAAAAATAGCATAAATCTGA : 10249  
 A CTCTCCTACAATGCTAAAAATTTAT TT CCCTCCATCATACTAATCCCTGACCTGACTATCAAAAAATAGCATAAATCTGA

guanaco : ATTAATCCAACAATATATAGCCTACTAATTAGCCTTATTAGTCTATCCCTACTTAGTCAATACAGTGACAACAGCACTAAT : 10331  
 vicuña : ATTAATCCAACAATATATAGCCTACTAATTAGCCTTATTAGCCTTATTAGTCTATCCCTACTTAGTCAATACAGTGACAACAGCACTAAT : 10331  
 ATTAATCCAACAATATATAGCCTA TAATTAGCCTTATTAG CTATCCCTACTTAG CAATACAGTGACAACAGCACTAA T

guanaco : TCTCGCTCCTATTTTTCTCAGATGCTCTATCAGCACCCCTACTGGTCTTAAACACATGGCTACTACCCCTAATACTAATTGC : 10413  
 vicuña : TCTCGCTCCTATTTTTCTCAGATGCTCTATCAGCACCCCTACTGGTCTTAAACACATGGCTACTACCCCTAATACTAATTGC : 10413  
 TCTC CTCTATTTTTCTCAGATGCTCTATCAGCACCCCTACTGGTCTTAAACACATG TACT CCCCTAATACTAATTGC

guanaco : CAGCCAGTCTCACCTTCCAAAGAACCCCTTACACGAAAAAGCTATACATCACTATACTAATTTCTACTACAAGTTCTCCTA : 10495  
 vicuña : CAGCCAAATCTCACCTTCCAAAGAACCCCTCAGCAGAAAAAACTATATATTACTATACTAATTTCTACTACAAGTTCTCCTA : 10495  
 CAGCCA TCTCACCTTCCAAAGAACCCCT ACACGAAAAA CTATA AT ACTATACTAATTTCTACTACAAGTTCTCCTA

guanaco : ATCATAACATTCACTGCATCAGAACAATCATGTTCTACATCCTATTTGAGCAACCCCTAGTCCCTACCCTAATTATTATCA : 10577  
 vicuña : ATCATAACATTCACTGCATCAGAACAATCATGTTTATATCCTATTTGAGGCAACCCCTAGTCCCCACCTAATTATCATCA : 10577  
 ATCATAACATTCACTGCATCAGAACAATCATGTT TA ATCCTATTTGA GCAACCCCTAGTCCC ACC TAATTAT ATCA

guanaco : CCCGATGAGGTAAATCAAACAGAACGACTTAATGCAGGCTCCTATTTCTTATTTTACACCCCTAGCAGGATCTCTTCCCTCCT : 10659  
 vicuña : CCCGATGGGGCAATCAAACAGAACGACTTAATGCAGGCTCCTATTTCTTATTTTACACCCCTAGCAGGATCTCTTCCCTCCT : 10659  
 CCCGATG GG AATCAAACAGAACGACTTAATGCAGGCTCCTATTTCTTATTTTACACCCCTAGCAGGATCTCTTCC CTCTCCT

guanaco : AGTTGCACTTGTCTACATCCAAAACAGTAGGCTCCTTAAATTTTCTAATTATGCAATACTGAAACCAACCCCTAATAGAC : 10741  
 vicuña : AGTGGCACTTGTCTATATCCAAAACAGTGGCTCCTTAAATTTTCTAATTATGCACTACTGAAACCAACCCCTAATAGAC : 10741  
 AGT GCACTTGTCTA ATCCAAAACAGT GGCTCCTTAAATTTTCTAATTATGCA TACTGAAACCAACCC TAATAGAC

guanaco : TCCTGATCCAATGCAGCTGCTATGACTAGCATGCATAATAGCATTATAGTAAAAATACCCCTATACGGCTTACACCTATGAC : 10823  
 vicuña : TCCTGATCTAATGCAGCTGCTATGACTAGCATGCATAATAGCATTCTATAGTAAAAATACCCCTATACGGCTTACACCTATGAC : 10823  
 TCCTGATC AATGCAGCTGCTATGACTAGCATGCATAATAGCATT ATAGT AAAATACCCCTATACGGC T CA CT TGAC

guanaco : TGCCTAAGGCTCATGTAGAAGCCCCAATTGCAGGATCCATAGTCTGGCCGCACTCTGCTCAAACCTAGGAGGCTACGGCAT : 10905  
 vicuña : TGCCTAAGGCCATGTAGAAGCCCCAATTGCAGGATCCATAGTCTGGCTGCACTCTGCTCAAACCTAGGAGGCTACGGCAT : 10905  
 TGCCTAAGGC CATGTAGAAGCCCCAATTGCAGGATCCATAGTCTGGC GCAGTCTGCTCAAACCTAGGAGGCTACGGCAT

guanaco : ACTACGCCCTCACAGCTATACTAAATCCCCTCACAGAGTATATAGCATATCCATTTCTAATACTATCCCTCTGAGGCATAATT : 10987  
 vicuña : ACTACGCCCTCACAGCTATACTAAATCCCCTAACAGAGTATATAGCGTACCCATTTCTAATACTATCCCTCTGAGGCATAATT : 10987  
 ACTACGCCCT ACAGCTATA TAAATCCCCT ACAGAGTATATAGC TA CCATTTCTAATACTATCCCTCTGAGGCATAATT

guanaco : ATGACTAGTCCATCTGCTTACGCCAAACTGACCTAAAGTCACTTATTGCCTACTCCTCAGTTAGTACATGGCCCTGGTTA : 11069  
 vicuña : ATGACCACTCCATCTGCTTACGCCAAACTGACCTAAAGTCACTTATTGCCTACTCCTCAGTTAGTACATGGCCCTAGTTA : 11069  
 ATGAC AGCTCCATCTGCTTACGCCAAACTGACCTAAAGTCACT ATTGC TA TCCTCAGTTAGTACAT GCCCT GTTA

guanaco : TTGTAGCTATCTTAATCCAAACTCCCTGAAGTACATAGGGGCTACCACCCCTCATAGTTGCCACGGACTCACATCCTCTAT : 11151  
 vicuña : TTGTAGCTATCTGATCCAAACTCCCTGAAGTACATAGGGGCTACCACCCCTCATAGTTGCCACGGACTCACATCCTCTAT : 11151  
 TTGTAGCTAT CT ATCCAAACTCCCTGAAGTACATAGGGGCTACCACCCCTCATAGTTGCCACGGACT ACATCCTCTAT

guanaco : ACTTTTCTGTCTAGCAATACAAATATGAAGTACCCACAGTCGAACAATAATCCTGGCCGAGGCTGCAAACTACTACTA : 11233  
 vicuña : ACTTTTCTGTCTAGCAATACAAATATGAAGTACCCACAGTCGAACAATAATCCTAGCCGAGGCTGCAAACTACTACTA : 11233  
 ACTTTTCTGTCTAGCAATACAAATATGAAGTACCCACAGTCGAACAATAAT CT GCGGAGGCTGCAAACTACTACTA

guanaco : CCTTTAATAGCAATATGATGATTACTGGCAAGTCTCACTAACCTGGCCCTACCCCTACAATTAATCTACTTGGAGAGTTGT : 11315  
 vicuña : CCTTTAATAGCAATATGATGATTACTGGCAAGTCTCACTAACCTGGCCCTACCCCTACAATTAATCTACTTGGAGAGTTAT : 11315  
 CCTTTAATAGCAATATGATGATTACT GCAAG CTCACATA CTGGCCCTACCCCT ACAATTA CTACT GGAGA TT T

guanaco : TCGTAATATAGCCCTCATTCTCCTGATCTAACATCACAATTATCCTAATGGGAGCCAACATGATAATCACAGCCCTATATTC : 11397  
 vicuña : TCGTAATATAGCCCTCATTCTCCTGATCCAACATCACAATTATCCTAATGGGAGCCAACATGATAATCACAGCCCTATATTC : 11397  
 TCGTAATATAGCCCTCATTCTCCTGATC AACATCACAATTATC TAAT GG GCCAACATGATAATCACAGCCCTATA TC

guanaco : ATGATATATGCTCATATAACACAACGAGGAAATCATACCTACCACATCAACAATATTAACCCTTACACACGAGAAAAC : 11479  
 vicuña : ATATATATGCTCATATAACACAACGAGGAAATATACCCACCATATTAACAACATTAACCCTTACACACGAGAAAAC : 11479  
 AT ATATATGCTCATATAACACAACGAGGAAAT ATACC ACCA AT AACAA ATTAACCCTTACACACGAGAAAAC

guanaco : TCACCTCATAGCTTTACATATGCTCCCCCTACTAATGCTATCACTCAACCCCTAAAGTCACTATAGGCTTACATACTGTAAGT : 11561  
 vicuña : TCACCTCATAGCTTTACATATGCTCCCCCTACTAATGCTATCACTCAACCCCTAAAGTCACTATAGGCTTACATACTGTAAGT : 11561  
 TCACCTCATAGCTTTACATATGCTCCCCCTACTAATGCTATCACTCAACCCCTAAAGTCACT ATAGGCTTACATACTGTAAGT

guanaco : ATAGTTTAAAGAAACACTAGATTGTGAATCTAGCAGTAAGAGATTAACCTCTTTACTTACCGAAAAAGTATGCAAGAACT : 11643  
 vicuña : ATAAATTTAAAGAAACTAGATTGTGAATCTAGCAGTAAGAGATCAAACCTCTTTACTTACCGAAAAAGTATGCAAGAACT : 11643  
 ATA TTTAAAGAA ACTAGATTGTGAATCTAGCAGTAAGAGAT AAAACTCTTTACTTACCGAAAAAGTATGCAAGAACT

guanaco : GCTAACTCATGCCACCATGCCTAACAGCATGGCTTTTTCAAACCTTTTAAAGGATAGAAGTAAATCCGTTGGCCTTAGGAGCCA : 11725  
 vicuña : GCTAACTCATGCCACCATGCCTAACAGCATGGCTTTTTCAAACCTTTTAAAGGATAGAAGTAAATCCGTTGGCCTTAGGAGCCA : 11725  
 GCTAACTCATGCCACCATGCCTAACAGCATGGCTTTTTCAAACCTTTTAAAGGATAGAAGTAAATCCGTTGGCCTTAGGAGCCA

guanaco : AAAAATTTGGTCAACTCCAAATAAAAAGTAATAAACATATTCACCTACCTTCGCACTACTTACACTATTATTACTCACACTACC : 11807  
 vicuña : AAAAATTTGGTCAACTCCAAATAAAAAGTAATAAACATATTCACCTACCTTCGCACTACTTACACTATTATTACTCACACTACC : 11807  
 AAAAATTTGGTCAACTCCAAATAAAAAGTAATAAACATATTCACCTACCTTCGCACTACTT ACACTATTATTACTCACACTACC

guanaco : AATTATAATATCAACTTCTGACATTTATAAGAGCAACAATACCCCTCTCTACGTAAAAAATACCATCGCATGTGCCTTCACT : 11889  
 vicuña : AATTATAATATCAACTTCTGACATTTATAAGAGCAACAATACCCCTCTCTACGTAAAAAATACCATCGCATGTGCCTTCACT : 11889  
 AATTATAATATC ACTTCTGACATTTATAAGAGCAACAATACCC CTCTACGTAAAAA ACCATCGCATGTGCCTTCACT

guanaco : GTAAGTCTAATCCAACTATAATATTTATTACCTAAACCAAGAAGTCATTATCTCAAACGACATTGAATCACAATCCACA : 11971  
 vicuña : GTAAGTCTAATCCAACTATAATATTTATTACCTAAACCAAGAAGTAATATCTCAAACGACATTGAATCACAATCCACA : 11971  
 GTAAGTCTAATCCAACTATAATATTTAT CACCTAAACCAAGAAGT ATTATCTCAAACGACA TGAATCACAAT CACA

guanaco : CACTAAAACCTTCACTTAGTTTTAAAATAGATTACTTCTCAATAATATTTGTACCAATTGCACATTTGTAACCTGTCTAT : 12053  
 vicuña : CACTAAAACCTTCACTTAGTTTTAAAATAGATTATTTTCGCAATAATATTTGTACCAATTGCACATTTGTAACCTGTCTAT : 12053  
 CACTAAAACCTTCACTTAGTTTTAAAATAGATTA TTC CAATAATATTTGTACCAATTGCACATTTGTAACCTG TC AT

guanaco : CGTAGAATTCATATATGATATATGCACTCAGACCCCAATATTAATAAATCTTTAAGTATCTTCTTCTATTTCTCATCACA : 12135  
 vicuña : CGTAGAGTTTTCAATATGATACATACACTCAGACCCCAATATCAACAAATCTTTAAGTACCTTCTCTATTTCTCATCACA : 12135  
 CGTAGA TT TCAATATGATA AT CACTCAGACCC AATAT AA AAATCTTTAAGTA CTCT CTATT CTATCACA

guanaco : ATATTAATCTAGTAACGCAATAAATTTTCAACTATTTATGGCTGAGAGGGAGTAGGGATCATGTCTTTCTTACTAA : 12217  
 vicuña : ATACTAATCCTAGTAACGCAATAAATTTTCAATATTTATGGTTGAGAGGGGTAGGGATCATGTCTTCTTGTCTAA : 12217  
 ATA TAAT CTAGTAACGCAATAA TATTTCAA TATTTATTGG TGAGAGGG GTAGGGATCATGTCT TCTT CTAA

guanaco : TTGGGTGATGATATGGCCGACAGACGCAAAATACAGCAGCCCTACAAGCAATCTGTATAACCGCATTGGAGACATTGGATT : 12299  
 vicuña : TTGGGTGATGATACGCGCCGACAGACGCAAAATACAGCAGCCCTCAAGCAATCTGTACACCGCATTGGAGACATTGGATT : 12299  
 TTGGGTGATGATA GGCCGACAGACGCAAAATACAGCAGCCCT CAAGCAATCTGTATAACCGCATTGGAGACAT GGATT

guanaco : TGTAGCATCCATAGCATGATTTCTTTCCAACCTAAATACATGAGAAATACAACAAATCTTTATTTCTCACACAAGACTGCC : 12381  
 vicuña : TGTAGCATCCATAGCATGATTTCTTTCCAACCTAAATACATGAGAAATACAACAAATCTTTATCTCTCACACAAGACTGCC : 12381  
 TGTAGCATCCATAGCATGATTTCTTTCCAACCTAAATAC TGAGAAAT CAACAAATCTTTAT CTC CACAAGACTGCC

guanaco : ACCGCACCCTAATGGGACTCCTCCTAGCCGAGCAGGAAAATCTGCCAATTTGGCTTACACCCTTGACTACCCTCTGCAA : 12463  
 vicuña : ACTGCACCCTAATGGGGCTCCTCCTAGCCGAGCAGGAAAATCTGCCAATTTGGCTTACACCCTTGACTACCCTCTGCAA : 12463  
 AC GCACCCTAATGGG CTCTCCTAGCCGAGC GAAAATCTGCCAATTTGGCTTACACCCTTGACT CCCTCTGCAA

guanaco : TAGAAGGCCCCACTCCGCTCTCCGCCCTACTACACTCAAGCACAATAGTCGTAGCAGGGGATTTCTACTCATCCGATTTTA : 12545  
 vicuña : TAGAAGGCCCCACTCCGCTCTCCGCCCTACTACACTCAAGCACAATAGTCGTAGCAGGGGATTTCTACTCATCCGATTTTA : 12545  
 T GAAGGCCCCACTCCGCTCTCCGCC TA T CACTCAAG ACAATAGTCGTAGCAGGGGATTTCTACTCATCCGATTTTA

guanaco : CCCACTGATAGAAAACAACAGACCCGCCAGACACTCAGCCTATGTTAGGCGCAATCACCACCCTATTTACAGCAATCTGC : 12627  
 vicuña : TCCACTAATAGAAAACAACAGACTGCTCAAACACTTACGCTATGCTTAGGCGCAATCACCACCCTATTTACAGCAATCTGC : 12627  
 CCACT ATAGAAAACAACAGAC GC CA ACCT ACCTATG TTAGGCGCAATCACCACCCTATTTACAGCAATCTGC

guanaco : GCCCTAACTCAAAATGATATCAAAAAAATGTAGCCTTCTCCACCTCAAGCCAATAGGTCTTATAATAGTAACGATTGGCA : 12709  
 vicuña : GCCCTAACTCAAAATGATATCAAAAAAATGTAGCCTTCTCCACCTCAAGCCAATAGGTCTTATAATAGTAACGATTGGCA : 12709  
 GCCCTAACTCAAAATGATATCAAAAAAAT GTAGCCTTCTCCACCTCAAGCCA CTAGGTCTTAT ATAGTAACGATTGGCA

guanaco : TTAACAGCCTCACCTTGATTTCTACATATCTGCACATGCTTTCTTCAAGCCATACTATTTATATGCTCAGGCTCTAT : 12791  
 vicuña : TTAATCAGCCACCTGGCATTTCTACATATCTGCACACGCTTTCTTCAAGCCATACTATTTATATGCTCAGGCTCTAT : 12791  
 TTAA CAGCC CACCT GCATTTCTACATATCTGCAC CA GCTTTCTTCAAGCCATACTATTTATATG TCAGGCTCTAT

guanaco : CATCCACAGCCTAAACGACGAAACAGACATCCGAAAAATAGGAGGCTTTACAAGACGATACCCTTTACCACCGCAGCTCTT : 12873  
 vicuña : CATCCATAGCCTAAACGACGAAACAGACATTCGAAAAATAGGAGGCTTTACAAGACATACCCTTTACCACCGCAGCCTTT : 12873  
 CATCCA AGCCTAAACGACGA CAAGACAT CGAAAAATAGG GGCTTTACAAGAC AT CCCTTTACCACC CAGC CTT

guanaco : ATCATCGGAAGCCTAGGCTTGACTGGAATCCCTTTCTCACGGGATTTACTCCAAGGACATAATATTTGAAGCTGCCAATA : 12955  
 vicuña : ATCGTGGGAGCCTAGCCTTGACTGGAATCCCTTTCTCACAGGATTTACTCCAAGGACATAATATTTGAAGCTGCCAATA : 12955  
 ATC TCGG AGCCTAG CTTGACTGGAAT CCCTTTCT AC GGATTTACTCCAAGGACATAATATTTGAAGCTGCCAA A

guanaco : CGTCATACACCAACGCTGAGCCCTCTTATTACTTTAGTCGTACATCTCTCACAGCCATTTACAGCACACGCATCATCTT : 13037  
 vicuña : CGTCATACACCAACGCTGAGCCCTCTTATTACTTTAATCGCTACATCTCTCACAGCCATTTACAGCACACGCATCATCTT : 13037  
 CGTCATACACCAACGCTGAGCCCTC TTATTACTTTA TCGCTACATCTCTCACAGCCATTTACAGCACACGCATCATCTT

guanaco : CTATGCCCTCTAAACCAACCTCGCTTCCCCCACTAATCCTAATTAACGAGAACAACCCCTCTCATCAGCTCCATTA : 13119  
 vicuña : CTACGCCCTCTAAACCAACCCCGCTTCCCTCCATTAATTTAATTAACGAAAAACAACCCCTCTTAACTCCATTA : 13119  
 CTA GCCCTC TAAACCAACC CGCTTCCC CCA TAAT TAATTAACGA AACAACCCCTCT AT A CTCCATTA

guanaco : CGCCTTCTTATCGGAAGCATCTTCTGCTGGATTTTTATCTCCTACAACATCCCCCTATAACAGTCCCTCAAATAACATGC : 13201  
 vicuña : CGCCTTCTTATCGGAAGCATCTTCTGCGGATTTTTATCTCCTACAACATCCCCCTATAACAGTCCCTCAAATAACATGC : 13201  
 CGCCTTCTTATCGGAAGCATCTTCTGC GGATTTTTATCTCCTACAACAT CC CTTATAACAGTCCC CAATAACATGC

guanaco : CATCACCTAAAACCTGCGCCCTCTTAGTCACAATTTAGGCTTTATCTTGGCAATAGAAATCAACACCATAACAAAA : 13283  
 vicuña : CATCGCACCTAAAACCTACCGCCCTCTTAGTCACAATTTAGGCTTTACCCTAGCAATAGAAATCAACACCATAACAAAA : 13283  
 CATC CACCTAAAACCT CCGCCCT TAGTCACAATTTAGGCTTTA CCT GCAATAGAAATCAACACCATAACAAAA

guanaco : CCTAAAATTTACTCAGCCCTCAAATCATTCAAATTTCTCTAACCTTCTAGGCTTCTCCCTATTATTATACACCGTCTAGTG : 13365  
 vicuña : CCTAAAATTTACTCAACCCCTCAAATCATTCAAATTTCTCAACCTTCTAGGTTCTCCCTATTATTATACACCGTCTGGTA : 13365  
 CCTAAAATTTACTCA CCCTCAAATCATTCAAATTTCTC AACCTTCTAGG TTCTTCCCTATTATTATACACCGTCT GT

guanaco : CCCTATCTAAATCTACTAATAAGCCAAAAATCAGCGTCTGTGTGCTAGATTTAGTCTGACTGGAGCCGCTCTACCAAAAA : 13447  
 vicuña : CCCTATCTAAATCTACTAATAAGCCAAAAATCAGCGTCTGTGTGCTAGACTTAGTCTGACTGGAAACCGCTCTACCAAAAA : 13447  
 CCCTATCTAAATCTACTAATAAGCCAAAAATCAGCGTCTGT TTGCTAGA TTAGTCTGACTGGAA CCGCTCTACCAAAAA

guanaco : CCCTTGCCTTTATACAAGTAAAAGCCTCCACATTAGTCTCAGATCAAAAGGGACTCATTAAGCTCTATTTCCCTCTCATTCT : 13529  
 vicuña : CCCTCGCCCTCATAAAGTAAAAGCCTCTACATTAGTCTCAGATCAAAAGGGACTCATTAAGCTTTACTTCCTCTCATTCT : 13529  
 CCCT GCCCT ATACAAGT AAAAGCCTC ACATTAGTCTCAGATCAAAAGGGACTCATTAAGCT TA TTCCCTCTCATTCT

guanaco : CATCACACTAACCCATAATATAATTTTATTTAATTTACCCTGTAATTTCTATAATAACCCTACACCAATAAGTAAAGCACC : 13611  
 vicuña : CATCACACTAACCCCTGATTATAATTTCTATTTAATTTACCCTGTAATTTCTATAATAACCCTACACCAATAAATAAAGCACC : 13611  
 CATCACACTAACCCCT ATTATAAT TATTTAATTTACCCTGTAATTTCTATAATAACCCTACACCAATAA TAAGCACC

guanaco : ATCCAGTAATGATAACTAACCAAGTACCCTAAGTACTGTATAAAGCAGCGATTCCTATAGCTTCTTCACTAAAAATCCAGATC : 13693  
 vicuña : ACCCAGTAACGATAACTAACCAAGTACCCTAAGTACTGTATAAAGCAGCAATTCCTATAGCTTCTTCACTAAAAATCCAGATC : 13693  
 A CCAGTAA GATAACTAACCAAGTACCCTAAGTACTGTATAAAGCAGC ATTCCTATAGCTTCTTCACTAAAAATCCAGATC

guanaco : CCCTGTATCATAAACCACTCAATCTCCTACCCCATTAACCTTAAAAATAAAATCGACCTCTTCCCCTTCAATACATAAACA : 13775  
 vicuña : TCCTGTGTATAAACCACTCAATCCCCACCCCGTTAAACTTAAAAATAAAATCAACCTCCTCCCCTTCAATACATAGATA : 13775  
 CCTGT TCATAAACCACTCAATC CC ACCCC TTAACCTTAAAAATAAAATC ACCTC TCCCCTTCAATACATA A A

guanaco : ACTATTAATATTTCCACCACCAACCAAAAGTAAAAGCCCTAGCACCGTCTTATTAGACACCCAGACCTCCGGATCTGCT : 13857  
 vicuña : ACTATTAATATTTCTACCACCAACCAAAATAAAAGTCCCTAGCACTGTCTTATTAGACACCCAAACCTCCGGATTTGCT : 13857  
 ACTATTAATATTTCC ACCACCAACCAAAA TAAAAG CCCTAGCAC GTCTTATTAGACACCCA ACCTCCGGATA TGCT

guanaco : CCGTGGCTATCGCTGTAGTATAACCAAGACCACCATTCCTCCTAAATAAATCAAAAACACTATTAACCCAAAGAAAGA : 13939  
 vicuña : CCGTGGCTATCGCTGTGGTATAACCAAAACCTACCATTTCCCCCTAAATAAATCAAAAACACTTAAAGCCTAAAGAAAGA : 13939  
 CCGTGGCTATCGCTGT GTATAACCAAA AC ACCATTATCCC CCTAAATAAATCAAAAACAC ATTAA CC AAGAAAGA

guanaco : TCCACCATAACTTAATACAAATATAACAACCAACCCACCACCTCACAATTAACCCCTAACCCACCAATAAATCGGAGAGGGCTTA : 14021  
 vicuña : CCCCCATTAATTAATACAAATATAACAACCAACCCACCACCTCACAATTAACCCCTAAATCCACCATAAATCGGAGAGGGCTTA : 14021  
 CC CCATAACTTAATACAAAT ATACAACCAACCCACCACCTCACAATTAACCCCTAA CCACCATAAATCGGAGAGGGCTTA

guanaco : GAAGAAAACCTAATAAACCCAATTACAATAATAACTCAAATAAATACAATGTACGTATCATACATTTCTACATGGACT : 14103  
 vicuña : GAAGAAAACCTAATAAACCCAATTACAATAATAACTCAAATAAATACAATGTACGTATCATACATTTCTACATGGACT : 14103  
 GAAGAAAACCTAATAAACCCAATTACAATAATAACTCAAATAAATACAATGTACGTATCATACATTTCTACATGGACT

guanaco : CTAACCAGACTAATGACATGAAAAATCATCGTTGTAATTCAACTATAAGAACCTTAATGACCAATATCCGAAAGTCCCACC : 14185  
 vicuña : CAAACCATGACTAATGACATGAAAAATCACCGTTGTAATTCAACTATAAGAACCTTAATGACCAACATCCGAAATCCCACC : 14185  
 C AACCA GACTAATGACATGAAAAATCA CGTTGTAATTCAACTATAAGAACCTTAATGACCAA ATCCGAAA TCCCACC

guanaco : CACTACTAAAAATTTGTCAATAACGCATTTATTGATCTTCCAGCCCCCTCAATATCTCATCATGATGAAACTTCGGCTCCCT : 14267  
 vicuña : CGCTACTAAAAATTTGTCAACAACGCATTTATTGACCTTCCAGCTCCCTCTAACATCTCATCATGATGAAATTTCCGGCTCCCT : 14267  
 C CACTAAAAATTTGTCAA AACGCATTTATTGA CTTCAGC CCCTCTAA ATCTCATCATGATGAAA TTCGGCTCCCT

guanaco : CCTAGGAATCTGCTTGATTATGCAAAATCATGACAGGACTATTTCTAGCAATACATTATACATCAGACACAGCAACAGCCTTC : 14349  
 vicuña : GCTAGGAATCTGCTTAAATGCAAAATCATGACAGGACTGTTTCTAGCAATACATTATACATCAGACACAGCAACAGCCTTC : 14349  
 CTAGGAATCTGCTT ATTATGCAAAATCATGACAGGACT TTTCTAGCAATACATTATACATCAGACACA CAACAGCCTTC

guanaco : TCTTCAGTCCGACACATCTGCCGAGACGTAATACGGCTGAATTATTCGCTACCTACAGCCAAATGGTGCCTCCATATTCT : 14431  
 vicuña : TCTTCAGTCCGACACATCTGCCGAGACGTAATACGGCTGAATTATTCGTTACCTACAGCCAAATGGTGCCTCCATATTCT : 14431  
 TCTTCAGTCCGACACATCTGCCGAGACGTAATTACGGCTGAATTATTCG TACCTACAGCCAAATGGTGCCTCCATATTCT

guanaco : TCATCTGCTTGATATCCACGTAGGTCGTGGGCTTTACTACGGCTCCTACGCCTTCTAGAGACTTGAATATTGGAATTAT : 14513  
 vicuña : TCATCTGCTTGATATCCACGTAGGTCGTGGGCTTTACTACGGCTCCTACGCCTTCTAGAACTTGAACATTTGGAATTAT : 14513  
 TCATCTGCTTGATATCCACGTAGGTCGTGGGCTTTACTACGG TCCTACGCCTTCTAGAACTTGAACATTTGGAATTAT

guanaco : CCTATTATTACAGTCATAGCAACAGCTTTTATGGGCTATGTACTCCCATGAGGCCAAATATCATTTTGGAGGGCAACAGTA : 14595  
 vicuña : TCTACTATTACAGTCATAGCAACAGCTTTTATGGGCTATGTACTCCCATGAGGCCAAATATCATTTTGGAGGGCAACAGTA : 14595  
 CTA TATTACAGT ATAGCAACAGCTTTTATGGGCTATGTACTCCCATGAGG CAATATCATTTTGGAGGGCAACAGTA

guanaco : ATTACAAACCTACTCTCGGCAATTCATATGTTGGCACAACTAGTCGAATGAATTTGAGGAGGGTTCTCCGTAGATAAAG : 14677  
 vicuña : ATTACAAACCTACTCTCAGCAATTCATACGTTGGTACAACTAGTCGAGTGGATTTGAGGAGGATTTCTCCGTAGATAAAG : 14677  
 ATTACAAACCTACTCTC GCAATTCATA GTTGG ACAAACTAGTCGA TG ATTTGAGGAGG TTCTCCGTAGATAAAG

guanaco : CCACCCTTACACGATTTCTCGCCTTCCACTTTATCTTACCTTTTGTCAATTCAGCTCTAGCAGGAGTACATCTACTATTTTT : 14759  
 vicuña : CCACCCTTACACGATTTCTCGCCTT CACTTTATCTTACCTTT CATCATTCAGCTCTAGCGGGAGTACATCTACTATTTTT : 14759  
 CCACCCTTACACGATTTCTCGCCTT CACTTTATCTTACCTTT TCATTCAGCTCTAGC GGAGTACATCTACTATTTTT

guanaco : ACACGAAACAGGCTCCAACAATCCAACAGGAATTTCTCGGATATAGACAAAATCCCTTCCATCCCTACTATACAAATAAA : 14841  
 vicuña : ACACGAAACAGGCTCCAACAACCCAACAGGAATTTCTCAGATATAGACAAAATCCCTTCCATCCCTACTACACAATAAA : 14841  
 ACACGAAACAGGCTCCAACA CCAACAGGAATTTCTTC GATATAGACAAAAT CCCTTCCATCCCTACTA ACAATAAA

guanaco : GACATTTAGGAGTACTACTACTTATTTCTGACCTACTTCTACTCGTACTATTTCTACCAGACTACTAGGAGACCCCGACA : 14923  
 vicuña : GACATTTAGGAGCACTACTACTTATTTCTGATTTCTACTCCTACTCGTACTATTTCTACCAGACTACTAGGAGACCCCGACA : 14923  
 GACATTTAGGAG ACTACTACTTATTTCTGA CTACT CTACTCGTACTATTTCTACCAGAC TACTAGGAGACCCCGACA

guanaco : ACTATACTCCCGTAACCCCTCAACACACCCGCTCATATTAACCAGAGTGATACTTCTATTTGCATATGCCATCCTACG : 15005  
 vicuña : ACTATAACCCCGTAACCCCTTAAACACACCCACCCATTAACCAGAGTGATATTTCTATTTGCATATGCTATTTCTACG : 15005  
 ACTATACT CCGCTAACCCCT AACACACC CC CA ATTAACCAGA TGATA TTCCTATTTGCATATGC AT CTACG

guanaco : ATCCATCCCAACAAATTAGGCGGCTACTGGCTCTAGTCTCTATCCTAATTTAGCACTCATCCCTTACTACACACA : 15087  
 vicuña : ATCGATCCCAATAAATTAGGCGGCTACTAGCCCTAATCCTCTCTATCCTAATCCTAGCACTCATCCCTTACTACACACA : 15087  
 ATC ATCCCAA AAATTAGGCGGCTACT GC CTA TCCTCTATCCTAAT CTAGCA TCATCC TACTACACACA

guanaco : TCAAAACAACGAGCATAATATTCGCCCTATCAGCCAGTGCCTGTCTGAACTCTAGTGGCGACTTACTAACTTTAACCT : 15169  
 vicuña : TCAAAACAACGAGCATGATATTCGCCCCATCAGCCAATGCCTGTCTGAACTCTAGTGGCGACTTACTAACTTTAACCT : 15169  
 TCAAAACAACGAGCAT ATATTCGCCCC ATCAGCCA TGCTGTCTGAACTCTAGTGGCGAC TACTAACTTTAACCT

guanaco : GAATTTGGAGGACAGCCAGTCGAACCCCTTATTTATAATTTGGCAAGTAGCATCTATCCTACTTCTCCCTAATCCTAAT : 15251  
 vicuña : GAATTTGGAGGACAGCCAGTCGAACCCCTTATTTATAATTTGGCAAGTAGCATCTATCCTACTTCTCCCTAATCCTAAT : 15251  
 GAATTTGGAGGACAGCCAGTCGAACCCCT TT AT ATAATTTGG CAAGT GCATC AT CTATACTTCTCC TAATCCTAAT

guanaco : TTTAATGCCAGTAGCAGGAATTTTAAAACACATTTTAAAATGAAGAGTCTTCGTAGTATATTGATTACGCTGGTCTTGT : 15333  
 vicuña : TTTAATGCCAGTAGCAGGAATTTGAAAACACATTTTAAAATGAAGAGTCTTCGTAGTATATTGATTACGCTGGTCTTGT : 15333  
 TTTAATGCCAGTAGCAGGAAT ATTTGAAA CACATTT AAAATGAAGAGTCTTCGTAGTATATTGATTAC CTGGTCTTGT

guanaco : AAGCCATCAAAGGAGATCGTACCCTCCCTAAGACTCAGGGAAGGGCCAAAGCCCTACCACCAGCACCCAAAGCTGGAATT : 15415  
 vicuña : AAGCCATCAAAGGAGATCGTACCCTCCCTAAGACTCAGGGAAGGGCCAAAGCCCTACCACCAGCACCCAAAGCTGGAATT : 15415  
 AAGCCATCAAAGGAGATCGTACCCTCCCTAAGACTCAGGGAAG GCCAA GCCCTACCACCAGCACCCAAAGCTGGAATT

guanaco : CTTATTAACCTACCCTGATCCACCACAACCCGCGGCATAGTCTTGAACAATGCTCTAGAACTAAAAGAAAATATCATG : 15497  
 vicuña : CTTATTAACCTACCCTGATCCCGCCGCAACCCGCGGCATAGTCCCAAAATAACTCTAGTACTAAAAGAGAATTTCTATG : 15497  
 CTTATTAACCTACCCTGATCCC CC CAACCG CCGCATAGTCC AA AAT CTCTAG ACTAAAAGA AAT ATG

guanaco : TCTAACATACATAAACCTCAATACTTACATGTACAGCACGCGTTCGCTGTATATGTACATCGTGCATAAAATTTGTTGC : 15579  
 vicuña : CCTGATATGCATAAACCTCAATACTTACATGTACAGCACGCGTTCGCTGTATATGTACATCGTGCATAAAATTTGTTGC : 15579  
 CT A AT CATAAACCTCAATACTTACATGTACAGCACGCGTTCGCTGTATATGTACATCGTGCATAAAATTTGTTGC

guanaco : CCCATGCATATAAGCATGTACATCTTATTTCTGTTGCTGCATAGCCATTATGTCAAATCATTTCCAGTCAATACGCATATC : 15661  
 vicuña : CCCATGCATATAAGCATGTACATCTTATTTCTGTTGCTGCATAGCACATCATGTCAAATCATTTCTAGTCAATACGCATATC : 15661  
 CCCATGCATATAAGCATGTACATCTTATTTCTGTTGCTGCATAGC CAT ATGTCAAATCATTTCC AGTCA TACGCATATC

guanaco : ATAACCCATAGATCACGAGCTTAATCACCAGCCGCGTGAATCATCAACCCGCTCGGCAGGGATCCCTCTTCTCGCTCCGG : 15743  
 vicuña : ATCACCATAGATCACGAGCTTAATCACCAGCCGCGTGAATCATCAACCCGCTCGGCAGGGATCCCTCTTCTCGCTCCGG : 15743  
 AT ACCCATAGATCACGAGCTTAATCACCAGCCGCGTGAATCATCAACCCGCTCGGCAGGGATCCCTCTTCTCGCTCCGG

guanaco : GCCATCCATCGTGGGGTTTCTATACCGGAACCTTACCAGGCATCTGGTTCTTACTTCAGGACCATCTCACCTAAAATCGC : 15825  
 vicuña : GCCATCCATCGTGGGGTTTCTATACCGGAACCTTACCAGGCATCTGGTTCTTACTTCAGGACCATCTCACCTAAAATCGC : 15825  
 GCCATCCATCGTGGGGTTTCTATAC GGAACCTTACCAGGCATCTGGTTCTTACTTCAGGACCATCTCACCTAAAATCGC

guanaco : CCACACTTTCTCTTAAATAAGACATCTCGATGGACTAATGACTAATCAGCCATGCTCACACATAACTGTGGTGTCAAGCA : 15907  
 vicuña : CCACACTTTCTCTTAAATAAGACATCTCGATGGACTAATGACTAATCAGCCATGCTCACACATAACTGTGGTGTCAAGCA : 15907  
 CCACACTTTCTCTTAAATAAGACATCTCGATGGACTAATGACTAATCAGCCATGCTCACACATAACTGTGGTGTCA GCA



guanaco : TTTGGTATTTTATAATTTGGGGGGGGAACTTGCAAGGACTCCGCTATGGCCGTCTGAGGCCCGTCGCAGTCAAATCAAT : 15989  
 vicuña : TTTGGTATTTTATAATTTGGGGGGGGAACTTGCAAGGACTCCGCTATGGCCGTCTGAGGCCCGTCGCAGTCAAATCAAT : 15989  
 TTTGGTATTTTATA TTTGGGGGGGGAACTTGCAAGGACTCCGCTATGGCCGTCTGAGGCCCGTC CAGTCAAATCAAT

guanaco : TGAAGCTGGACTTAATAAATATCATTACCCGCATCATAACAACCATAGGTGCTATTGAGTCCATGGTTACAGGACATAACT : 16071  
 vicuña : TGAAGCTGGACTTAATGAATATCATTACCCGCATCATAACAACCATAGGTGCTATTGAGTCCATGGTTACAGGACATAACT : 16071  
 TGAAGCTGGACTTAAT AATATCATTACCCGCATCATAACAACCATAGGTGCTATTGAGTCCATGGTTACAGGA ATAACT

guanaco : ACAACACACACCCACGTACACATGCGCATGCGCATGCACACACCCACGTACACGTACGCATACACACCCACACCCACCGTACA : 16153  
 vicuña : ACAACACTCACCC----- : 16084  
 ACAACAC CACCC

guanaco : CGTACGCATACACACCCACGTACACGTACACGTACGCATACACACCCACACCCACGTACACGTACGCATACACACCCACGTA : 16235  
 vicuña : ----- : -

guanaco : CACGTACACGTACGCATACACACCCACGTACACGTACACGTACGCATACACACCCACGTACACGTACACGTACGCATACACA : 16317  
 vicuña : ----- : -

guanaco : CCCACGTACGCACACACGTACACGTACGCACGCATTTAGCAAGTATTTAGCTTGCTTAAACAACCCCCCTTACCCCCCA : 16399  
 vicuña : ----- : -

guanaco : CGAGCTCCACCTTATACACCAGACAGTCTTGCCAAACCCAAAACAAGACATAGCGCATAAACTATAGAACCCGGACAAAC : 16481  
 vicuña : ----- : -

guanaco : CTTTGCCACAAACCAACTTCTTAAATAATCACATGGCCAAATCGTACCAATGTGTTACTCTAGTATATTAATAAATATACA : 16563  
 vicuña : ----- : -

guanaco : GACAGCTATCTCCCTAGATCCGCCAAAATTTTAAACAGAATTCAACAGCCTTTTAAATGGCGGCCCCCCCCCATAAATG : 16645  
 vicuña : ----- : -

guanaco : ACCC : 16649  
 vicuña : ---- : -

## Anexo II

## Símbolos de los aminoácidos

| Aminoácido      | Símbolo de tres letras | Símbolo de una letra |
|-----------------|------------------------|----------------------|
| Alanina         | Ala                    | A                    |
| Arginina        | Arg                    | R                    |
| Asparagina      | Asn                    | N                    |
| Acido Aspártico | Asp                    | D                    |
| Cisteína        | Cys                    | C                    |
| Glutamina       | Gln                    | Q                    |
| Acido Glutámico | Glu                    | E                    |
| Glicina         | Gly                    | G                    |
| Histidina       | His                    | H                    |
| Isoleucina      | Ile                    | I                    |
| Lisina          | Lys                    | K                    |
| Metionina       | Met                    | M                    |
| Fenilalanina    | Phe                    | F                    |
| Prolina         | Pro                    | P                    |
| Serina          | Ser                    | S                    |
| Treonina        | Thr                    | T                    |
| Triptofano      | Trp                    | W                    |
| Tirosina        | Tyr                    | Y                    |
| Valina          | Val                    | V                    |