



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS
Área Ciencias Biológicas

Tesis presentada para optar al grado de Doctor de la
Facultad de Ciencias Exactas

**“Caracterización de genes vinculados
al crecimiento y al color de capa en la
Llama (*Lama glama*)”**

Lic. María Silvana Daverio

Directora: Dra. Lidia A. de Vidal Rioja
Co-Directora: Dra. Florencia Di Rocco
Asesora Académica: Dra. María Olga Suescun

2014

El presente trabajo de Tesis, para optar al grado de Doctor de la Facultad de Ciencias Exactas se realizó en el Laboratorio de Genética Molecular del Instituto Multidisciplinario de Biología Celular (**IMBICE**) de CONICET-CICPBA, La Plata. Para ello obtuve becas de la Comisión de Investigaciones Científicas de la Provincia de Buenos Aires (2009- 2012) y del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (2012-2014). Además, se contó con aportes de **PIP 0278** (2009-2011) y **PIP 00370** (2012-2014) a cargo de la Dra. Lidia A. de Vidal Rioja y **PICT 2010-1658** (2011-2013) a cargo de la Dra. Florencia Di Rocco.

“Y les doy estos consejos
Que me ha costado alquiritlos,
Porque deseo dirigirlos;
Pero no alcanza mi cencia
Hasta darles la prudencia
Que precisan pa seguirlos.

Estas cosas y otras muchas
Medité en mis soledades.
Sepan que no hay falsedades
Ni error en estos consejos:
Es de la boca del viejo
De ande salen las verdades.”

(versos del Martín Fierro por José Hernández)

Dedico mi trabajo de tesis doctoral

A mis padres:

Mirta y José

Quiero expresar mi agradecimiento a

- Dios, a la Virgen del Carmen, a la Virgen del Rosario de San Nicolás y a San Expedito por iluminarme a cada momento y en todas las decisiones que tomé.
- A mis padres, Mirta y José. Por las palabras de aliento, por los abrazos contenedores, por el apoyo incondicional. Por darme la libertad y la seguridad de ser la persona que soy.
- A Mario (mi hermano), por aguantar mis ideas locas, mis ausencias, por escucharme, por sus consejos y sus silencios. Algo tan simple y tan grande como lo que sos: MI HERMANO!
- A la Dra. Lidia Vidal Rioja, por aceptarme para trabajar en el Laboratorio de Genética Molecular, por la confianza depositada en mí y por darme la oportunidad de seguir haciendo ciencia.
- A la Dra Florencia Di Rocco (Di Rocco para mí), por confiar en mí, por el respeto y la dedicación que pusiste a la hora de encarar este proyecto que nos hizo crecer profesional y personalmente. Gracias por tu interés y principalmente por ayudarme en el análisis, interpretación de los datos y por tu mirada crítica en la redacción de esta tesis. Por tu amistad!
- A Miriam Silbestro. Por tu paciencia, tu buena predisposición. Por los “tips” y los protocolos que me enseñaste. Por el cariño y tantos gestos buenos que tuviste conmigo. Que bueno fue encontrarte!
- Al Dr Jorge S López Camelo (Director de Investigación del CEMIC). Por ayudarme en el análisis estadístico y por aceptar ser mi codirector de beca!
- A la Dra María Olga Suescun (Asesora Académica) por su disposición en los trámites que fueron necesarios para concluir mi tesis entre la Fac. de Exactas y el IMBICE.
- Al Dr Gustavo Parisi (Bioinformática estructural de Proteínas-UNQ) por todo lo que me enseñaste sobre el modelado y el estudio estructural de proteínas.
- Al Dr Eduardo Frank (Lab. de fibras animales-UCC) le agradezco su disposición, colaboración e interés en nuestros trabajos moleculares. Especialmente sus enseñanzas sobre fibras especiales y Camélidos sudamericanos.
- Al Ing. textil Oscar Adot (Fundación Hábitat) le agradezco por sus valiosos conocimientos en el área de la industria textil, desarrollo de tecnologías y en fibras especiales.
- A los productores de Llamas Carlos Poplasky (Establecimiento Lama Malal-San Luis), Gustavo Maluendez (Criadero de Llamas Gulla-Bs-As), Ana Papeschi (Criadero de Llamas Kunu-Entre Ríos) por abrirnos las puertas de sus establecimientos, por el interés mostrado en el tema de tesis y colaborar en la obtención de las muestras.
- Al Dr Emilio De Simone (Fac. de Cs.Veterinarias-UBA) por la ayuda brindada en la obtención de muestras y por enseñarme la técnica de extracción de sangre de vena en las Llamas.
- Al Dr Marcelo Miragaya (Teriogenología- Fac. de Cs.Veterinarias-UBA) y a su grupo de trabajo por la colaboración brindada en la toma de muestras de Llamas.
- A la Vet. Sandra Romero y al Ing. Hugo Lamas (INTA EEA Abra Pampa-Jujuy) y por su intermedio a todo el personal de INTA Abra Pampa, por la ayuda

-
- prestada en la obtención de muestras de sangre de las Llamas y por el interés mostrado en el proyecto de color.
- Al Depto de Ganadería de Catamarca por la colaboración obtenida a través de su personal en la toma de muestras en diferentes departamentos de la Provincia de Catamarca.
 - Al Ing. Francisco Rigalt (INTA-Catamarca) por no dudar en colaborar con nuestros proyectos de Llamas y de vicuñas. Por la hospitalidad brindada en cada viaje de campaña a la Puna y por ayudar en la toma de muestras.
 - A la Dra Gisela Marcopido (INTA-Castelar) por su desinteresada colaboración en la toma de muestras.
 - A Yésica Lorenzo y a la Lic. Melina Anello que no dudaron en darme una mano cuando fue necesario. Gracias chicas!
 - A la mejor bibliotecaria que existe, Gisela Vigo (IMBICE) por conseguirme hasta el paper más difícil y en tiempo récord. Gracias por colaborar con todo el material de lectura que necesité para elaborar este trabajo.
 - A todo el personal administrativo del IMBICE, a César Horgan y a Rubén ya que mis días en el Instituto no hubieran sido lo mismo sin cada uno de UDS. Desde que entraba con el saludo de Rubén, hasta los mates talismánicos, la calidez y enseñanzas de César. Gracias a Todos!
 - Al Grupo de Becarios del IMBICE, por la camaradería que existió entre nosotros, en las buenas y en las malas. Por tantas charlas compartidas en los laboratorios comunes, gracias por haber formado parte de esto.
 - A mi familia toda y a mis amigos/as de la vida, que festejan conmigo los logros y supieron comprender tantas ausencias. Gracias por hacerme sentir que los tengo cerca cuando las distancias en km son tan largas.
 - Al personal de Posgrado de la Fac. Cs. Exactas (UNLP), a Laura Bakas y a Luciano por el interés en solucionar cualquier inconveniente que surgió y la buena comunicación que hubo entre nosotros.

A todos y cada uno de los que me apoyaron, colaboraron desinteresadamente, me ayudaron a crecer y formarme en mi profesión:

¡¡¡MUCHAS GRACIAS!!!

Publicaciones derivadas del presente trabajo de tesis

En revistas Internacionales con referato

- “The Llama (*Lama glama*) Growth Hormona gene: sequence, organization and SNP identification.” (2012). **S. Daverio**, F. Di Rocco, L. Vidal Rioja. *Small Ruminant Research*, 103: 108 – 111.
- “Genetic diversity of GH and Lep genes in Argentine Llama (*Lama glama*) populations”. (2014). **María S Daverio**, Yesica Lorenzo, Francisco Rigalt, Lidia Vidal Rioja, Florencia Di Rocco. *Small Ruminant Research*, 120: 20-26

Capítulos en libros

- Growth hormone gene in Llama (*Lama glama*): characterisation and SNPs identification. (2011). **Daverio, M.S.**, F. Di Rocco and L. Vidal Rioja, 2011. *Fibre production in South American camelids and other fibre animals*. Ed. Wageningen Academic Publishers. pp. 135-139.

Presentaciones en reuniones científicas

- **M.S. Daverio**, F. Di Rocco, L. Vidal Rioja. Growth Hormone gene in Lama glama (Llama): Characterization and SNPs identification. 5th European Symposium on South American Camelids and First European Meeting on Fibre Animals. Sevilla, España. 2010.
- **Daverio S**, F. Di Rocco, F. Rigalt, L.Vidal Rioja. Análisis de la variabilidad del gen Hormona de Crecimiento en Llamas (*Lama glama*) de Jujuy y Catamarca. “XL Congreso Argentino de Genética, III Simposio Latinoamericano de Citogenética y Evolución, I Jornadas SAG-NEA”. Corrientes. 18 al 21 de Septiembre de 2011.
- **Maria S. Daverio**; Florencia Di Rocco and Lidia Vidal Rioja. Identification of allelic variants in Melanocortin-1 receptor gene in Llama (*Lama glama*). 33rd International Society for Animal Genetics Conference. Cairns, Australia. 15 al 20 Julio de 2012
- **Daverio, M.S.**, Di Rocco, F., Rigalt, F., Romero, S., Vidal Rioja, L. Caracterización del Exón 4 en el gen ASIP y su asociación con el color de capa en llamas Argentinas. VI Congreso Mundial de Camélidos Sudamericanos. Arica. Chile. 21 al 23 de Noviembre, 2012.
- **Daverio, M.S.**, Di Rocco, F., Rigalt, F., Romero, S., Vidal Rioja, L. MC1R Y ASIP: genes involucrados en definir el color de capa en llamas. XLII

Congreso Argentino de Genética y III Reunión Regional SAG-NOA. Salta.
20-23 de octubre 2013.

Resumen

La Llama es el Camélido doméstico más abundante de Argentina. La cría de Llamas constituye una actividad económica de gran importancia debido a que es una especie poliproductora de carne, fibra, cuero y transporte. Actualmente existe interés creciente por mejorar el rendimiento y calidad de estos productos. El estudio de genes candidatos permite vincular las variaciones de un carácter y la manera en que éste se manifiesta en el fenotipo del individuo. En ese contexto la hormona de crecimiento (GH), producto del gen GH1 y secretada por la glándula pituitaria, estimula el crecimiento de huesos y músculos. Por otra parte, es bien conocido el interés que existe en la producción de fibras por determinados colores con mayor valor comercial. La determinación del color de capa en mamíferos se debe a la interacción de los genes MC1R (receptor 1 de melanocortina) y ASIP (péptido de señalización *Agouti*). Ambos controlan el tipo y localización de pigmento eumelánico (negro-marrón oscuro o sepia) o feomelánico (rojo-amarillento) producido. Esta Tesis tuvo por objetivo caracterizar y analizar la diversidad genética del gen GH1 y realizar la caracterización molecular de las variantes alélicas de MC1R y ASIP en Llamas con distintos fenotipos de colores de capas. Mediante PCR se amplificaron y luego secuenciaron los tres genes. El gen GH1 mostró un alto nivel de variabilidad encontrándose 15 SNPs, mayormente situados en región no codificante. Sin embargo se identificaron dos polimorfismos en el promotor y uno en la región 5' no traducible. Dado que los polimorfismos localizados en el promotor podrían afectar los niveles de expresión del gen, se concluye que los mismos pueden ser útiles en futuros estudios de asociación. Con respecto al gen MC1R se identificaron 13 SNPs en región codificante, 10 de los cuales fueron no sinónimos. La combinación de 3 de estos polimorfismos permitieron diferenciar Llamas con capas pigmentadas (A259/A376/T383) de las blancas no albinas (BNA) que carecían de pigmento (G259/G376/C383). En ASIP el hallazgo más importante fue una delección de 57pb en el Exón 4 con posible pérdida de función. De esta manera, el alelo delecionado en homocigosis se observó en Llamas eumelánicas y el alelo sin deleccionar en estado homocigota o heterocigota, se vió en Llamas feomelánicas. La identificación de los alelos de los genes MC1R y ASIP permitió proponer un mecanismo por el cual se genera la pigmentación feomelánica y eumelánica (TO) en las Llamas.

Abstract

The lama (*Lama glama*) is the most abundant domestic camelid in Argentina. The breeding of lama is an important economic activity due to the multiproducer character of the species on meat, fiber, leather and transportation. Currently there is high interest to improve the performance and quality of its products. The study of candidate genes allows linking variations of a character and shows the way it is manifested in the phenotype of the individual. In this context growth hormone (*GH*) secreted by the pituitary gland acts on bone and muscle stimulating their growth. On the other hand, it is well known that certain colors of the lama fibers have higher commercial value than others. The determination of coat color in mammals is due to the interaction of the *MC1R* (Melanocortin-1 receptor) and *ASIP* (*Agouti* signaling peptide) genes. Both genes control the type and location of eumelanin (black-brown) and pheomelanin (red-yellow) pigments produced. The objective of this Thesis was to characterize and analyze the genetic diversity of the *GH1* gene and identify allelic variants of *MC1R* and *ASIP* genes at molecular level in lamas with different coat color phenotype. The three genes were amplified by PCR and then sequenced. The *GH1* gene showed high variability. Fifteen SNPs were found mostly located in non-coding region while two polymorphisms were identified in the promoter and one in the 5' untranslated region (5'UTR). Since the polymorphisms located in the promoter could affect the gene expression level, they may be useful for future association studies. Thirteen SNPs were identified in the *MC1R* coding region, ten of which were non-synonymous. The combination of three of these polymorphisms allowed to differentiate lamas with pigmented coats (A259/A376/T383) from non-albino white (BNA) who lack the pigment (G259/G376/C383). The most important finding in *ASIP* gene was a 57bp deletion in exon 4 with probable loss of function. Homozygosity of deleted allele were observed in eumelanin lamas while non deleted allele in either homozygous or heterozygous state, was found in pheomelanin lamas. The identification of *MC1R* and *ASIP* alleles allowed to propose a mechanism by which eumelanin and pheomelanin pigmentation in lama is generated.

INDICE

Lugar de realización y Financiamiento	ii
Agradecimientos	iv
Publicaciones derivadas del presente trabajo de tesis	vi
Resumen	viii
Abstract	ix
Indice general	11
Indice de tablas	14
Indice de Figuras	15
Abreviaturas	17
1. Introducción	19
1.1 Camélidos Sudamericanos	20
1.2 Distribución y características	20
1.3 Aportes destinados al mejoramiento de la carne de Llama	21
1.3.1 Gen de Hormona de Crecimiento	22
1.4 Aportes destinados al mejoramiento de la fibra de Llama	23
1.5 Genes involucrados en la definición de color de capa en los mamíferos	28
1.6 Genética del color en Camélidos domésticos (alpacas)	31
2. Hipótesis	34
3. Objetivos	35
3.1 Objetivos Generales	36
3.2 Objetivos Específicos	36
4. Materiales y Métodos	37
4.1 Muestras	38
4.1.1 Toma de muestras	39
4.2 Diseño de primers (cebadores)	39
4.3 Amplificación por PCR y Electroforesis	41

4.4 Purificación y Secuenciación	41
4.5 Análisis de las secuencias y caracterización de los genes	42
4.6 Estudios de la diversidad genética	43
4.7 Test de Neutralidad de Tajima	43
4.7.1 Test de McDonald-Kreitman	44
4.8 Detección de selección positiva utilizando sustituciones sinónimas (dS) y sustituciones no-sinónimas (dN)	45
4.9 Definición de los alelos	45
4.10 Análisis de los genotipos de MC1R y ASIP en los colores de capa seleccionados	45
4.11 Predicción de estructura secundaria de la proteína MC1R y el efecto del cambio de un aminoácido por otro en la estructura/función	49
5. Resultados	50
5.1 GEN GH1	51
5.1.1 Caracterización del gen	51
5.1.2 Diversidad genética de GH1	53
5.1.3 Estructura primaria de la proteína de GH1	55
5.2 GEN RECEPTOR 1 DE MELANOCORTINA (MC1R)	57
5.2.1 Caracterización del gen y estudio de su diversidad	57
5.2.2 Test de selección	60
5.2.3 Estudio de las variantes alélicas del gen MC1R en los distintos grupos de color	60
5.3 PÉPTIDO DE SEÑALIZACIÓN <i>Agouti</i> (ASIP)	64
5.3.1 Caracterización del gen y estudio de su diversidad	64
5.3.2 Determinación de las variantes alélicas y estudio del gen en los grupos de color	66
5.4 Estudio de la segregación de los alelos de MC1R y ASIP y los fenotipos de color	72
5.5 Efecto de las sustituciones aminoacídicas en la estructura de las proteínas de MC1R y ASIP	73
5.5.1 MC1R	73
5.5.2 ASIP	74

6. Discusión	76
6.1 Caracterización y Diversidad genética de GH1, MC1R y ASIP	77
6.2 Distribución de los alelos y posibles mecanismos que explican los distintos colores de capa en las Llamas	79
7. Conclusiones	87
8. Bibliografía	90
9. Anexos	104

Indice de Tablas

Tabla 1. Procedencia y número de Llamas utilizadas en los diferentes estudios	38
Tabla 2. Secuencia nucleotídica de los cinco pares de primers con su correspondiente temperatura de annealing	40
Tabla 3. Secuencia de primers y T ^o de annealing utilizados para amplificar los genes MC1R y ASIP	40
Tabla 4. Reactivos utilizados para la mezcla de PCR	41
Tabla 5. Secuencias del GenBank utilizadas en el análisis	42
Tabla 6. Posición y secuencia de los elementos regulatorios identificados	52
Tabla 7. Ubicación de los SNPs y frecuencias alélicas	54
Tabla 8. Definición de los haplotipos de GH1	55
Tabla 9. Definición de los haplotipos de MC1R	59
Tabla 10. Tabla de contingencia correspondiente al Test MK	60
Tabla 11. Frecuencias haplotípicas de los alelos del MC1R obtenidas con los 3 SNPs	61
Tabla 12. Definición de los alelos	66
Tabla 13. Resultados del Test de Fisher	68
Tabla 14. Tabla con valores de subPSEC y P _{deletéreo} en el gen MC1R	74
Tabla anexa 1. Polimorfismos del gen MC1R: ubicación nucleotídica y frecuencias alélicas	109

Indice de Figuras

Fig. 1. Fenotipo silvestre de guanaco	25
Fig. 2. Diferentes fenotipos de color de capa de las Llamas	26
Fig. 3. Esquema de a) patrones de color de capa. b) distribución y tipos de manchas blancas en Llamas argentinas	27
Fig. 4. Esquema del proceso de melanogénesis	29
Fig. 5. Esquema del melanocito	30
Fig. 6a. Fenotipo Marrón rojizo con cara y extremidades negras (MCN) 6b. Fenotipo Tapado Oscuro (TO) 6c. Fenotipo Negro (TO) 6d. Fenotipo Tapado Claro (TC) 6e. Fenotipo Blanco no Albino (BNA)	46-48
Fig. 7: Esquema de la organización estructural del gen GH1 de Llama	51
Fig. 8: Esquema de la distribución de los SNPs en el gen GH1 de Llama	53
Fig. 9. Secuencia de la proteína de GH1 de Llama	56
Fig. 10. Alineamiento de la región del péptido señal de GH1	56
Fig. 11. Organización estructural del gen MC1R de Llama	57
Fig. 12. Relaciones haplotípicas del gen MC1R. a) con h=15 haplotipos. b) excluyendo los singletons	58 y 59
Fig 13. Distribución de los alelos del gen MC1R por grupo de color de capa	61
Fig. 14. Distribución de las combinaciones alélicas del gen MC1R	62
Fig. 15. Tipificación de la delección del Exón 4 de las Llamas en gel de agarosa	64
Fig. 16. Organización estructural del gen ASIP de Llama	65
Fig. 17. Distribución de los alelos del gen ASIP por grupo de color de capa	67
Fig. 18. Distribución de frecuencias genotípicas de ASIP	67
Fig. 19. Electroferograma proveniente de la secuenciación del Exón 4 del gen ASIP	69
Fig. 20 Genotipos de MC1R y ASIP observados para cada color de capa a. TC b. TO c. MCN d. BNA	70
Fig. 21. Diagrama que muestra la segregación de los alelos de los genes MC1R y ASIP	72
Fig. 22. Estructura 2D del gen MC1R	73
Fig. 23. Alineamiento del extremo carboxilo terminal de la proteína de ASIP que muestra la delección de 19 aminoácidos en Llamas con fenotipo TO	75

Fig.24 a) ejemplo de un perro feomelánico “e/e” b) ejemplo de un perro feomelánico “a ^y /-” y “E/E” en el gen MC1R	82
Fig. 25 a y b. Distribución de pigmento eumelánico en Llamas feomelánicas	83
Fig. 26 a) Llama MCN b) Caballo colorado o castaño c) Perro negro y tostado (black and tan) de raza Gordon Setter	85
Fig. anexa 1. Secuencia completa del gen GH1 de Llama, regiones adyacentes y proteína deducida (HM921333)	106
Fig. anexa 2. Electroferograma que muestra un alineamiento de secuencias del exón 4 de ASIP deletado y sin deletar en las Llamas	109

Abreviaturas utilizadas en este trabajo

µl	microlitro
rpm	revoluciones por minuto
°C	grado Celsius
pb	pares de bases
ml	mililitro
M	Molar
HCl	ácido clorhídrico
Cl ₂ Mg	cloruro de magnesio
min	minuto
mM	miliMolar
ClNa	cloruro de sodio
SDS	dodecilsulfato sódico
EDTA	ácido etilendiaminotetraacético
pH	potencial hidrógeno
hs	horas
LiCl	cloruro de litio
T°	temperatura
ng	nanogramo
KCl	cloruro de potasio
dNTP	desoxirribonucleótido trifosfato
Taq	polimerasa termoestable de <i>Thermus aquaticus</i>
PCR	reacción en cadena de la polimerasa
PEG	polietilenglicol
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
NCBI	National Center for Biotechnology Information
UTR	región no traducible
m.s.n.m.	metros sobre el nivel del mar
±	error estandar
U	Unidad
dN	sustitución no-sinónima
dS	sustitución sinónima

mg	miligramos
P-valor	valor de probabilidad, oscila entre 0 y 1

INTRODUCCION

1. Introducción

1.1 Camélidos Sudamericanos:

Los Camélidos modernos derivan de especies prehistóricas originadas en Norteamérica que desaparecieron de esa región hacen más de 11 millones de años. Antes de desaparecer, algunos Camélidos ancestrales migraron hacia el sur del continente para evolucionar en los Camélidos sudamericanos actuales.

Los Camélidos sudamericanos se clasifican taxonómicamente en el orden *Cetartiodactyla* (Hassanin y col., 2012), suborden *Tylopoda*, familia *Camelidae* y a nivel de género en *Lama* y *Vicugna*. Se reconocen dos especies silvestres: el guanaco (*Lama guanicoe*) y la vicuña (*Vicugna vicugna*) y dos domésticas: la Llama (*Lama glama*) y la alpaca (*Vicugna pacos*) (Wheeler 1995).

Recientes estudios moleculares han demostrado que la Llama se origina por domesticación del guanaco y la alpaca de la vicuña (Wheeler, 1995; Kadwell y col., 2001; Marin y col., 2007). Además, Vidal Rioja y colaboradores (1994) y Kadwell y colaboradores (2001) han confirmado la ocurrencia de una extensa hibridación entre Llamas y alpacas, que probablemente se inició en la época de la conquista Española y continúa hasta el día de hoy.

1.2 Distribución y características

Los Camélidos domésticos son la riqueza pecuaria y genética de un amplio sector de la población andina fuente de carne, fibra, cuero y transporte. De estos productos, la carne y la fibra son los que presentan mayor interés. En las zonas altas, donde la agricultura y ganadería de otras especies domésticas no son viables, la cría de Camélidos es el único medio de subsistencia de las familias rurales (Quispe y col., 2009).

Durante el imperio incaico la distribución de los Camélidos domésticos llegó hasta el nivel del mar en el Pacífico, hasta Colombia y Ecuador en el Norte, y en el Sur hasta el centro de Chile y la Argentina, lo que demuestra la posibilidad de adaptarse a diversos ambientes. La Llama y la alpaca constituyeron la ganadería doméstica autóctona hasta que fueron reemplazadas por el ganado europeo (cabras, ovejas y vacas) introducido por los conquistadores españoles. Durante este evento, los Camélidos domésticos fueron desplazados de las zonas costeras y de los valles hacia lugares marginales de gran altura donde el animal recién

introducido no podía adaptarse a tales condiciones extremas (Wheeler y col., 1992; Rossanigo y col., 1997).

En la actualidad, la distribución de la Llama abarca desde Perú y Bolivia hasta el centro de Chile y noroeste de Argentina; con algunas poblaciones en Ecuador y en el sur de Colombia (Wheeler, 1991). La alpaca abarca una franja desde el norte de Perú hasta el sur de Bolivia, con muy pocos animales en el norte de Chile (de Lamo 2011).

La Llama es el Camélido doméstico más abundante de Argentina. Las provincias con mayor concentración de Llamas son Jujuy (67%), Catamarca (16%) y Salta (12%). La cría y explotación de esta especie, circunscripta a economías puneñas, actualmente muestra una importante expansión a las provincias de Chubut, La Pampa, Mendoza, Santiago del Estero, Tucumán (FAO 2005) además de los criaderos que se encuentran en San Luis, Buenos Aires y Entre Ríos. Con el fin de producir fibra o como animales de compañía, las Llamas han sido exportadas a Estados Unidos, Australia y Nueva Zelanda donde se crían en condiciones más favorables que las de su ambiente de origen (Quispe y col., 2009).

De la familia de los Camélidos sudamericanos, la Llama es el animal de mayor tamaño. De acuerdo a la variedad fenotípica que presentan pueden tener pelos en el rostro (Tipo lanudo) o carecer de ellos (Tipo carguero). Dentro de las ventajas adaptativas que las diferencia de las especies introducidas se destacan la presencia de almohadillas digitales que evitan el deterioro del suelo por pisoteo además de la habilidad ramoneadora por la cual cortan el pasto sin arrancarlo de raíz debido a que poseen el labio superior hendido y una lengua no protruíble (Raggi y Ferrando, 1998).

1.3 Aportes destinados al mejoramiento de la carne de Llama

En la última década se incrementó el interés por mejorar el rendimiento y calidad de la carne y la fibra. Se han realizado varios estudios que demuestran que la carne de Llama tiene una calidad superior a la de otros ganados domésticos. La misma puede compararse en color, apariencia y textura con la carne de bovino (Mamani-Linares y Gallo, 2011) pero en promedio, la carne de Llamas tiene un contenido de colesterol (52,8 frente a 67 mg/100 g) y de grasa (12,6 vs 20,6%) mas bajo que la reportada para carne vacuna (Coates y Ayerza, 2004). En cuanto al porcentaje de proteínas Mamani-Lanares y Gallo (2011) encontraron que la

Llama tiene un valor más alto (23,88%) que la vaca (22,46%) y el caballo (21,41%). Resultados similares también fueron obtenidos por otros autores (Cristofanelli y col., 2004; Polidori y col., 2007).

En las Llamas destinadas a producción de carne la forma de caracterizar el crecimiento es a través de medidas corporales como el peso corporal, medidas del muslo, largo de la grupa (Leyva y Falcón 2007) y el perímetro torácico (Frank y col., 2009) entre otros. En un estudio realizado por Leyva y Falcón (2007) se encontró que las variables número de pariciones, edad y peso corporal de la madre tuvieron correlación positiva con el peso corporal de las crías. Incluso, el perímetro torácico correlacionó significativamente con el peso de las crías, por lo que este parámetro puede ser utilizado como criterio de selección.

1.3.1 Gen de la Hormona de Crecimiento

Considerando las cualidades de la carne de Llama resulta necesario mejorar la producción de este producto evaluando el desarrollo muscular del animal no sólo a través de métodos clásicos de mejora (medidas corporales) sino también aplicando diferentes técnicas moleculares que permitan identificar los animales portadores de la característica de interés.

La mayoría de los genes que componen el eje somatotrópico (hormona de crecimiento–factor de crecimiento insulínico tipo I) intervienen en la producción y/o regulación de fenotipos económicamente deseables en todo programa de cría y selección de animales domésticos. En este sentido, la hormona de crecimiento, GH, posee un importante efecto tanto en el desarrollo muscular durante el crecimiento como en la producción y composición de la leche durante la lactancia (Etherton y Bauman, 1998; Maj A et al, 2007).

La Hormona de Crecimiento, sintetizada y secretada por las células somatotropas de la glándula pituitaria, fue aislada por primera vez en el año 1930 (Lee y Schaeffer, 1934).

En la mayoría de los mamíferos, con excepción de los caprinos (Wallis y col. 1998), la hormona de crecimiento está codificada por un solo gen (GH1) mientras que en primates un cluster de genes codifica la GH hipofisaria. Estudios previos sobre la secuencia de GH en mamíferos han demostrado que es una proteína muy conservada, pero difiere en primates y cetartiodáctilos (Wallis 1996; Forsyth y Wallis, 2002).

En animales domésticos se han identificado numerosos polimorfismos en el gen GH1 involucrados con caracteres de interés productivo. Como ejemplo pueden citarse una mutación puntual que cambia una Treonina por Metionina en la posición 200 de la secuencia aminoácidica de GH que provoca la condición miniatura en bovinos de raza Brahman. La Treonina es uno de los ocho aminoácidos que participa en la unión de GH con su receptor y es requerida para el crecimiento normal (McCormack et al, 2009). También se identificaron SNPs en el gen GH1 asociados con el peso corporal (Kato y col., 2008; Ishida y col., 2010), características de la carcasa y composición de ácidos grasos (Ardiyanti et al. 2009) en ganado japonés de color negro. Polimorfismos encontrados en el intrón 4 y exón 5, estarían asociados con características de crecimiento y carcasa en toros Brangus, particularmente aquellos con genotipos heterocigotas de GH1 (Thomas y col., 2007). Además, en vacas lecheras y en cabras se encontraron varios SNPs en el gen GH1 que tienen efectos sobre condición corporal, fertilidad y composición de la leche (Mullen y col., 2011; Dettori y col., 2013).

Por su parte en los Camélidos, Martinat y colaboradores (1990) aislaron y caracterizaron GH1 en dromedario. Mientras, en alpaca se reportaron estudios sobre el aislamiento a partir de la glándula pituitaria, la caracterización (Biscoglio de Jimenez Bonino y col., 1981; Cascone y col., 1984) y la estructura primaria de la hormona de GH (Biscoglio de Jimenez Bonino y col., 1991). Sin embargo, en las Llamas aún falta conocer la secuencia, estructura y variación de GH1. Es por ello que el estudio de este gen aportará información necesaria para posteriormente realizar estudios de asociación de GH1 con caracteres de interés.

1.4 Aportes destinados al mejoramiento de la fibra de Llama

Por su parte, la fibra de Llama actualmente posee gran valor comercial debido a las buenas prácticas de manejo de animales, la propuesta de un programa de mejoramiento genético de Camélidos domésticos (PROMECAD, Frank 1997) y al desarrollo de nuevas tecnologías en el sector de la industria textil. Cabe destacar como parte del desarrollo industrial, el diseño y construcción en Argentina de una máquina descordadora (AM-2) que permite separar la fibra fina, de gran valor comercial, de la fibra larga y gruesa menos valiosa (Adot 2010). Las poblaciones de Llamas de Argentina poseen un alto potencial de producción de fibra fina (Hick

y col., 2009). El 48% de la fibra de la región del noroeste presenta un diámetro menor a 21 μm y solo el 16% mostró un diámetro mayor a 25 μm (Frank y col., 2006a). El diámetro de la fibra de Llama es similar al cashmere (19 μm –Lanari 2008) y de menor finura que la de mohair (24-28 μm – Sapag y Arrigo 2011).

En la producción textil, existe una fuerte demanda por el color de fibra blanco total porque es fácil de teñir y por los colores naturales tales como el negro, los colorados y castaños (Valbonesi y col., 2011).

Si bien el valor de la fibra de Camélidos depende mucho del diámetro de la misma, el color y tipo de fibra juegan un rol importante en la industria textil (Frank 1997; Frank y col., 2006a; Mueller y col., 2010). Entre esas variables se observó que el color afecta el coeficiente de variación del diámetro de la fibra y el peso (Frank y col., 2006b). Por esa razón el color es un objetivo importante de selección.

Tanto el color como el tipo de fibra se rigen por mecanismos mendelianos donde no se espera que la expresión del fenotipo esté influenciada por el ambiente (Frank y col., 2006a).

Numerosos aportes han sido realizados en el estudio del color de la fibra habiéndose obtenido resultados interesantes con respecto a la determinación química de la melanina y su diferenciación en tipos: eumelanina (negra y marrón) y feomelanina. En 1988 Sponenberg y colaboradores observaron que los colores negro y gris se deben al pigmento eumelánico y el rojizo generalmente se debe al pigmento feomelánico. Años más tarde, se confirmó lo estudiado por Sponenberg y colaboradores (1988) a través de análisis de variación cuantitativa de pigmentos. De esta manera quedó determinado que la cantidad de melaninas solubles en álcali y eumelanina disminuían a medida que el color de la fibra cambiaba de negro a marrón rojizo (Frank 2001; Cecchi y col., 2007). También se investigó la morfología y ultraestructura de los melanosomas de las Llamas. El melanosoma procedente de un fenotipo tapado oscuro ó negro mostraba, sobre una matriz de material electrodensó, una forma ovalada con membrana bien delimitada y las estriaciones típicas. Los melanosomas procedentes de animales con fenotipo tapado claro o marrón rojizo con cara negra, presentaron forma esférica, contenido de material amorfo, matriz transparente, manchas y acúmulos de melanina todo rodeado por gránulos de melanina. Por el contrario, en los

animales blancos no se observaron melanosomas (Frank 2001; Cecchi y col., 2004).

Se considera que la Llama cubre un rango de colores que permite satisfacer la creciente demanda de los tonos naturales. El color de capa en esta especie se refiere al color del vellón que recubre uniformemente el cuerpo del animal incluyendo las extremidades. Las diferentes tonalidades de la capa son producto del cambio paulatino en el sistema de manejo realizado por el hombre mediante el cual fue seleccionando características fenotípicas que creyó ventajosas.

La diferencia más relevante entre la Llama y su antecesor el guanaco son los distintos colores de capa que presentan. Los guanacos son uniformes en cuanto a su fenotipo silvestre característico, con dorso color canela y pecho y región ventral blancos (Fig. 1).



Fig. 1. Fenotipo silvestre de guanaco.

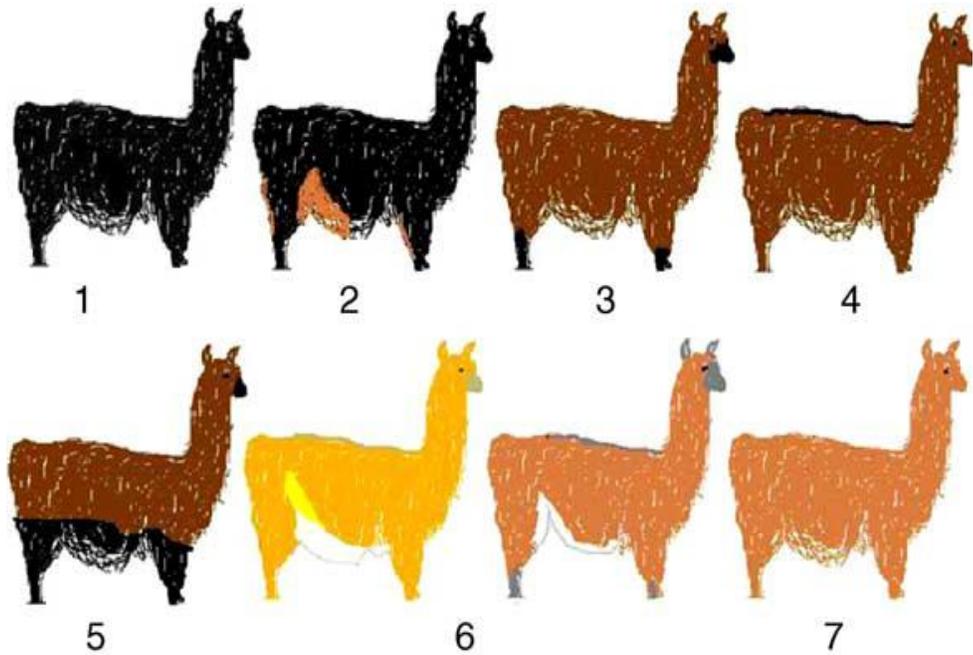
Reproducido de: <http://www.minutoya.com/17/05/2013/cooperativa-malarguina-fortalece-el-desarrollo-regional-produciendo-fibra-de-guanaco-y-vicunas/>

Por otro lado, las Llamas se caracterizan por una amplia gama de patrones y colores que poseen distinto valor comercial (Fig.2).

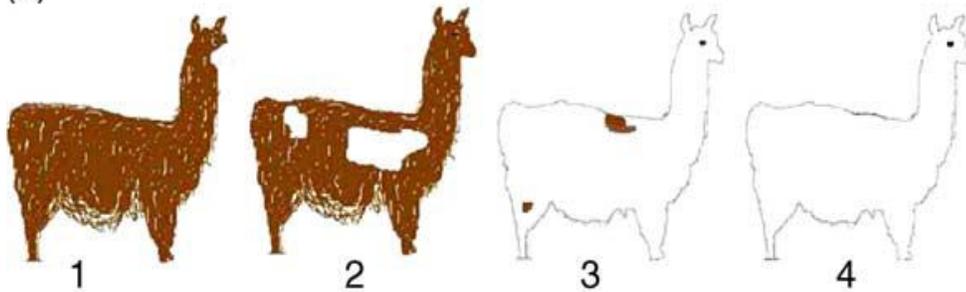


Fig. 2. Diferentes fenotipos de color de capa de las Llamas.

Basándose en el principio de homología con otras especies y recurriendo a medios de análisis directo (visual, cartillas comerciales y el sistema de colores de Munsell) Frank y colaboradores (1998a, 1998b) describieron los distintos fenotipos de color de capa de las Llamas (Fig. 3, Pag.27). Esta descripción fue utilizada después para el diseño e interpretación de esquemas de apareamiento y de segregación de fenotipos de color en esta especie (Frank 2001; Frank y col., 2006a).



(a)



(b)

Fig 3. Esquema de a) patrones de color de capa. (1) eumelánico (2) Doberman “oscuro con claro” (3) cara y extremidades negras (4) raya de mula (5) panza negra (6) silvestre vicuña; silvestre guanaco (7) feomelánico b) distribución y tipos de manchas blancas en Llamas argentinas. (1) marca (2) y (3) manchas irregulares (4) blanco (5) y (6) manchas regulares (7) diseño de mancha. Oscuros: eumelánicos; Claros: feomelánicos o mezcla; sin color: blanco. (Reproducido de Frank y col., 2006a)

Mediante esquemas de apareamientos de cruza, retrocruzas y cruza de prueba se estudiaron los fenotipos de mayor interés desde el punto de vista textil. Luego del análisis de segregación de las progenies obtenidas de diversos apareamientos, el autor concluyó que el fenotipo blanco uniforme no albino es dominante con penetrancia incompleta sobre los fenotipos manchados y los pigmentarios (Frank, 2001). El patrón marrón rojizo con cara y extremidades negras es dominante completo sobre el fenotipo eumelánico y sobre el silvestre. Siendo el eumelánico recesivo total con respecto a los demás fenotipos. El silvestre guanaco y el silvestre vicuña no fueron claros en su relación de segregación así como tampoco fue clara la segregación entre eumelanina negra y marrón. De acuerdo a Frank y colaboradores (2001, 2006a) en todos los casos los fenotipos pigmentarios son segregados por el locus *Agouti*.

1.5 Genes involucrados en la definición del color de capa en los mamíferos

El color de capa en los mamíferos es una forma importante de camuflaje, de reconocimiento o parte integrante de su comunicación social (Sponenberg 1997). Incluso es una característica que permite diferenciar razas no sólo en especies de caninos y equinos sino también en especies animales productores de fibra como cabras, alpacas y Llamas.

En general, la pigmentación en los mamíferos es un proceso altamente conservado a pesar de sutiles diferencias que existen entre especies.

El desarrollo de las células pigmentarias es crucial para la determinación del color de capa. Es necesario comprender este proceso para estudiar la compleja interacción de los numerosos genes que dan lugar a la gran variedad de coloraciones. En las células de la cresta neural embrionaria se diferencian los melanoblastos que migran a lo largo de la parte posterior y a los lados del cuerpo. A medida que el melanoblasto migra, se va diferenciando en melanocitos. Los melanocitos producen organelas internas llamadas melanosomas en los cuales los gránulos de pigmento, melaninas, son producidos en el proceso de melanogénesis. El melanosoma maduro se exporta desde el melanocito hacia células especializadas de la piel y el pelo que se llaman queratinocitos (Fig. 4) (Cieslak y col., 2011).

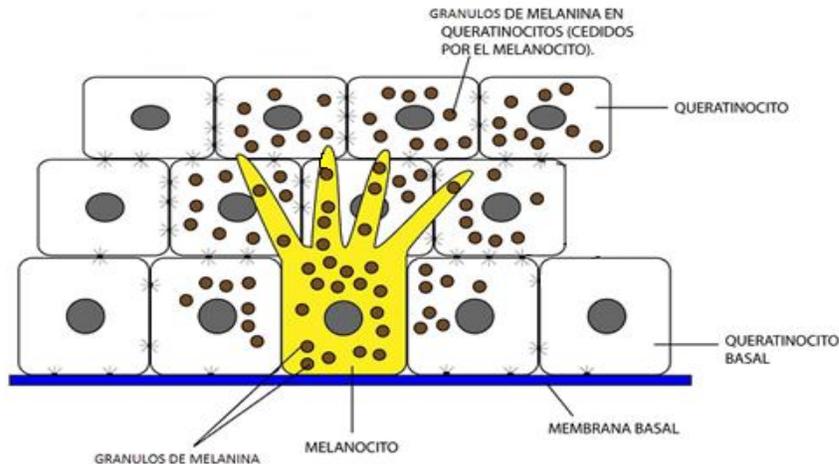


Fig. 4. Esquema del proceso de melanogénesis.

Reproducido y modificado de: <http://elmodernoprometeo.blogspot.com.ar/2012/01/melanogenesis-fabricacion-de-melanina-y.html>

En mamíferos existen dos tipos de melaninas: eumelanina (negro y marrón) y feomelanina (rojo/amarillento). La clasificación de los fenotipos de color en cuatro pasos sucesivos se basa en fenómenos fisiológicos gobernados por distintos genes que producen efectos notables en la síntesis de melaninas (Frank 2001):

- Primera dimensión ó patrones pigmentarios: debidos a la distribución de eumelanina y feomelanina en el cuerpo. Los *loci* actuantes son el *Agouti* y el *Extension*.
- Segunda dimensión ó tipos de eumelanina: describe la naturaleza de la eumelanina, si el fenotipo patrón es eumelánico o tiene partes eumelánicas. El *locus* actuante sería el *Brown* que determina si la eumelanina es negra ó marrón (sepia).
- Tercera dimensión o alteraciones de la pigmentación: pueden ser alteraciones debidas a la dilución o a la mezcla de pigmentos y son gobernadas por un grupo numeroso de *locus* y genes mutantes.
- Cuarta dimensión ó diseño de la mancha blanca: áreas sin pigmentación (blancas) cuyas formas son características de la acción de diferentes *loci*. En general se subdividen de acuerdo a la forma, tamaño y ubicación topográfica de la mancha blanca.

Las coloraciones básicas de capa se definen por la distribución de los pigmentos antes mencionados. Esa relación se controla principalmente por el sistema

ligando-receptor formado por la proteína de señalización *Agouti* (codificada por el gen ASIP) y el receptor 1 de melanocortina (codificado por el gen MC1R) (Cieslak y col., 2011). MC1R es un gen clave que regula el tipo de pigmentación producida. Este receptor es miembro de una familia de receptores transmembrana acoplados a proteína G, localizado en la superficie de los melanocitos. A través de la activación de la enzima tirosinasa (TYR), la señalización del MC1R induce a los melanocitos a sintetizar principalmente eumelanina. La actividad melanogénica de MC1R es activada por derivados peptídicos del procesamiento postraduccional que ocurre en pro-opiomelanocortina (POMC): la hormona alfa melanocito estimulante (α MSH), la hormona beta melanocito estimulante (β MSH) y la hormona adrenocorticotrópica (ACTH) (Cieslak y col., 2011) (Fig. 5).

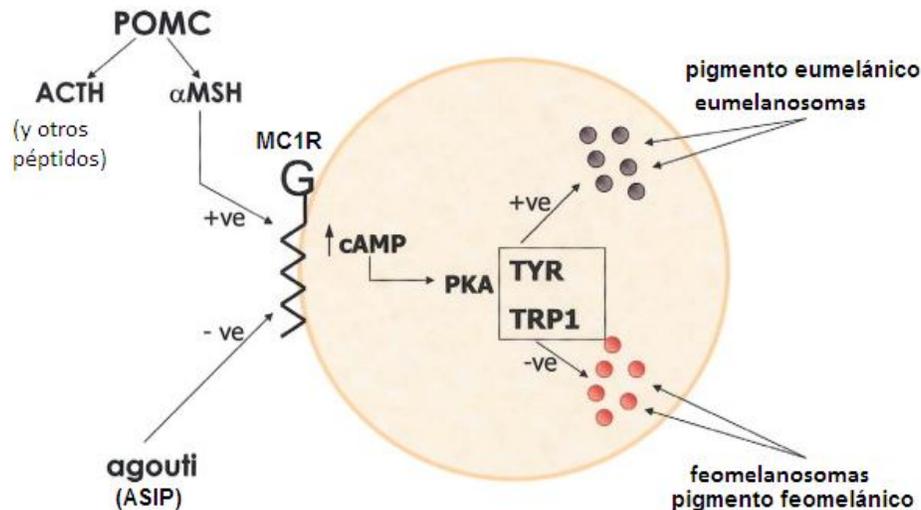


Fig. 5. Esquema del melanocito: muestra el receptor de membrana MC1R acoplado a proteína G (indicado por G). "+ve" y "-ve" indican regulación positiva y negativa de la relación entre eumelanina y feomelanina. TYR = tirosinasa; TRP1 = proteína relacionada a tirosinasa 1. cAMP= Adenosín monofosfato cíclico (Reproducido de Rees JL., Am. J. Hum. Genet. 75:739–751, 2004)

El MC1R presenta una jerarquía alélica característica, el alelo dominante (E) de color negro y el recesivo (e) de color amarillo. Las mutaciones con pérdida de función en el MC1R provocan un cambio hacia la síntesis de feomelanina. Tales mutaciones se asocian con la variación del color en muchas especies domésticas como por ejemplo conejo (Fontanesi y col., 2006), gato (Eizirik y col., 2003), perro (Schmutz y col., 2003), cerdo (Kijas y col., 1998) caballo (Marklund y col., 1996) y vacas (Joerg y col., 1996). En bovinos, se han descrito tres alelos del gen

MC1R: negro dominante, el silvestre y colorado (Klungland y col., 1995). Además de los tipos de pigmentos básicos, las mutaciones en MC1R también pueden conducir a patrones como máscara melánica que aparece en algunas razas como el Ovejero Alemán, el Bóxer y el Gran Danés (Schmutz y col., 2003).

ASIP es el segundo gen importante en la vía de señalización de MC1R. Aunque el MC1R es principalmente responsable del tipo de melanina producida, tanto MC1R como ASIP pueden influir en la distribución de la eumelanina y la feomelanina en diferentes partes del cuerpo. La interacción del MC1R y su antagonista ASIP (péptido de señalización *Agouti*) produce la síntesis de pigmentos feomelánicos por bloqueo de la interacción con alfa-MSH (Bultman y col., 1992; Lu y col., 1994) (Fig.5). ASIP presenta una jerarquía alélica característica con alelo dominante (A) de color rojo-amarillento y recesivo (a) de color negro. Como se espera para una relación ligando-receptor, los alelos del MC1R son epistáticos a los de ASIP, esto significa que los alelos de MC1R pueden enmascarar completamente cualquier expresión de los alelos de ASIP (Ollmann y col., 1998; Sponenberg 2001). Mutaciones con pérdida de función en *ASIP* producen fenotipos eumelánicos y han sido descritas en especies de animales domésticos tales como gato (Eizirik y col., 2003) perro (Kerns y col., 2004), caballo (Rieder y col., 2001) y oveja (Royo y col., 2008).

También se han descrito alteraciones en otros genes que causan una amplia gama de fenotipos (Cieslak y col., 2011). Además de ASIP, se encontró que mutaciones en el gen que codifica la beta defensina 103 producen fenotipos negros (Candille y col., 2007) y atigrados en perros (Kerns y col., 2007). Otros genes como KIT y MITF han sido asociados con fenotipos blancos o blancos manchados en algunas especies de caballos, cerdos y gatos (Brooks y Bailey, 2005; Giuffra y col., 1999; Pielberg y col., 2002; Cooper y col., 2005). Por último, la despigmentación en gatos domésticos ha sido asociada a mutaciones en el gen Tyr (Imes y col., 2006).

1.6 Genética del color en Camélidos domésticos (alpacas)

En las alpacas, al igual que en otros mamíferos, se realizaron diversos estudios relacionados al color de la capa. Se midieron las cantidades de melanina (eumelanina y feomelanina) en varios fenotipos. Los resultados mostraron que las cantidades de melanina alcalisoluble y eumelaninas tenían una estrecha

relación con el color de la fibra y que ambos aumentaban a medida que el color se profundizaba, desde blanco a negro (Fan y col., 2010). Cransberg y colaboradores (2013) sugirieron que el "marrón" en alpacas es causado principalmente por la feomelanina y que las variaciones entre los diferentes colores "marrones" son causadas por cambios en los niveles de feomelanina y cantidades relativas de eumelanina negra, en lugar de eumelanina marrón. Además la herencia de los colores de capa blanco, negro y marrón en esta misma especie fue abordada por Valbonesi y colaboradores (2011). Estos autores manifestaron que la herencia del blanco se debe a un único gen, dominante sobre la pigmentación, sin ningún efecto modificador e independiente de la segregación de los patrones negro y marrón. Sin embargo, la hipótesis de dominancia del negro sobre marrón no parece estar completamente apoyada por las segregaciones observadas en los cruzamientos.

En los últimos años, investigaciones en el campo de la genómica, identificaron varios SNPs en el gen MC1R de la alpaca algunos de los cuales estuvieron asociados con los fenotipos eumelánicos y feomelánicos (Powell y col., 2008; Feeley y Munyard 2009; Guridi y col., 2011 y Bathrachalam y col., 2011). En el gen ASIP también se observaron SNPs asociados a fenotipos eumelánicos y se encontraron diferentes transcriptos con expresión dependiente del color (Feeley y col., 2011; Bathrachalam y col., 2013). Otros genes estudiados en alpacas fueron tirosinasa (Tyr) y proteína asociada a la membrana de transporte (MATP) pero ninguno explicó la dilución del color de capa (Cransberg y Munyard, 2011).

Por su parte, Munyard (2011) realizó la caracterización molecular de algunos genes que intervienen en el proceso de pigmentación. Analizó el gen TYRP1 pero no encontró asociación entre los SNPs identificados y el color de capa marrón, sugiriendo que este color en alpacas puede originarse por otro mecanismo. La misma autora, realizó un estudio de expresión de varios genes en muestras de pieles y encontró que Rab38 tuvo expresión significativa en alpacas blancas. Además se reconocieron varios patrones de color de capa como el gris clásico, rosillo, condorilla (tipo esmoquin), manchado, pintado o tajlío, blanco con ojos celestes y blanco total. En aquellos patrones con datos suficientes, se propusieron los posibles alelos intervinientes y el grado de dominancia (Munyard 2011).

Por otra parte, Jackling y colaboradores (2012) analizaron el gen KIT en alpacas (proteína necesaria para la migración normal y supervivencia de los melanocitos)

con fenotipos blancos y ojos azules (BWE: blue-eyed white). Estos autores observaron que el alelo bew2 en homocigosis estuvo asociado al fenotipo en cuestión.

En Llamas, como se indicó anteriormente, la segregación del color ha sido abordada mediante genética clásica. Sin embargo, aún se desconocen los genes relacionados al mecanismo de pigmentación. Por lo tanto, el estudio de genes involucrados en la producción de pigmentos beneficiaría la obtención de fenotipos de color deseados basados en el conocimiento del genotipo.

2. Hipótesis general

En la Llama existe escasa información sobre la secuencia y variación de los genes vinculados al crecimiento y pigmentación. En otras especies se ha detectado una variedad de polimorfismos en los genes GH1, MC1R y ASIP involucrados en estos procesos.

H1: “Mediante la caracterización molecular de estos genes, se espera identificar polimorfismos potencialmente útiles como marcadores de caracteres de interés productivo”.

H2: “Los polimorfismos en los genes MC1R y ASIP están asociados con el color de capa”.

OBJETIVOS

3 Objetivos

3.1 Objetivo general

Estudiar los genes GH1, MC1R y ASIP involucrados en el crecimiento corporal y en la síntesis de pigmento en la Llama. Contribuir con la anotación de las secuencias de estos genes y disponer de las variantes alélicas que permitan identificar caracteres productivos en esta especie de la cual hasta el momento no se tiene información.

3.2 Objetivos específicos

- Caracterizar el gen GH1 y describir su promotor y elementos reguladores.
- Identificar polimorfismos en el GH1
- Caracterizar los genes MC1R y ASIP e identificar las variantes alélicas.
- Determinar la asociación entre las variantes alélicas encontradas y los patrones de color de capa observados en las Llamas

MATERIALES Y METODOS

MATERIALES Y METODOS**4.1 Muestras****GH1, MC1R y ASIP**

Se seleccionaron tres ejemplares de Llamas como referencia a partir de las cuales se determinó la secuencia nucleotídica para describir cada uno de los genes. La secuencia obtenida del gen GH1 se depositó en la base de datos del GenBank. En la Tabla 1 se detalla el origen y el número de animales que se utilizaron para los estudios de diversidad genética y los de asociación de genotipos con distintos fenotipos de color.

Para analizar la segregación de los alelos de MC1R y ASIP se tipificó un grupo familiar (Facultad de Veterinaria-UBA). Las relaciones de parentesco se confirmaron a través de pruebas de paternidad para las cuales se utilizó un panel de 10 microsatélites. Se compararon los perfiles genéticos de las crías con los de sus progenitores y el vínculo se determinó con una probabilidad del 98,88%.

Tabla 1. Procedencia y número de Llamas utilizadas en los diferentes estudios

		Estudios de diversidad genética			Estudio de asociación
		GH1 *N=23	MC1R *N=41	ASIP *N=19	MC1R y ASIP *N=87
Catamarca	Laguna Blanca	x	x	x	x
	Antofagasta de la Sierra	x	x	x	x
	Corral Blanco	x	x		
	Cabaña Karwai	x	x	x	
Jujuy	Abra Pampa	x	x	x	x
	Cusi-Cusi	x	x		
	Cieneguillas	x	x		
Buenos Aires	Criadero Gulla		x	x	x
	⁽¹⁾ Fac. de Vet.(UBA)		x	x	x
Entre Ríos	Villaguay	x	x	x	x
La Pampa	Santa Isabel	x	x		

*N = número de Llamas; ⁽¹⁾ Facultad de Veterinaria (Universidad de Buenos Aires)

4.1.1 Toma de muestras

Los muestreos se realizaron entre los 9 y 3484 m.s.n.m. Mediante punción de la vena yugular, se extrajeron 4ml de sangre que se colocaron en Vacutainer™ con una solución anticoagulante de citrato de sodio 0.129M. Los tubos se mantuvieron en frío en una conservadora y luego se colocaron en freezer a una temperatura de -20°C hasta su procesamiento.

El ADN genómico se obtuvo según un protocolo de extracción con Cloruro de Litio (Gemmell y Akiyama, 1996) modificado en el laboratorio (Anexo pág. 105). La cantidad y calidad del ADN extraído se determinó mediante el uso de un espectrofotómetro láser NanoDrop® ND-1000.

4.2 Diseño de primers (cebadores)

GH1

El gen GH1 se obtuvo por amplificación de cinco fragmentos de ADN consecutivos, solapados, de diferentes tamaños (290–894 pb) correspondientes a las siguientes regiones: promotora (GH promotor), 5'UTR (GH 5'UTR), codificante (GH E2-4), intron-exónica (GH I-E5), 3'UTR (GH 3'UTR). Los primers de los fragmentos GH 5'UTR, GH E2-4 y GH I-E5 fueron diseñados sobre la secuencia del gen de hormona de crecimiento de una alpaca disponible en el GenBank (número de acceso DQ782970), en tanto que los correspondientes a la región promotora y la 3'UTR fueron diseñados sobre secuencias conservadas de otras especies de cetartiodáctilos (cetáceos más artiodáctilos. Maniou y col., 2004). Inicialmente, el diseño de primers de la región promotora se realizó sobre secuencias consenso. Dada la ausencia de resultados satisfactorios, se realizó un nuevo diseño sobre la secuencia de esta misma región obtenida en Llama. Estos últimos primers se utilizaron para amplificar el total de las muestras en estudio (Tabla 2).

Tabla 2. Secuencia nucleotídica de los cinco pares de primers con su correspondiente temperatura de annealing

Fragmento	Primer 5' - 3'	Primer 3' - 5'	T ^o annealing [#]
GH Promotor*	TCTGCTACCTCCCCCTTAAAA	CCCCACATCACCCCTTCTGTA	55°C
GH 5 UTR	GAAAATAAGTGGGGGCAGAG	AGTTTCCTCCCATTATGCAG	55°C
GH E2-4	CTGGCTGCTGACACCTACAA	ACCAGGCTGTTGGTGAAGAC	55°C
GH I-E5	ATCCTGGGTAGCCTTCTCTC	GCACTGGAGTGGCACTTT	57°C
GH 3 UTR	TCCTCAGGCAAACCTACGAC	TGATGCAACCTCATTTTATTAGGA	55°C

(*)corresponde al último diseño de primers realizado en la región Promotora y utilizado en el total de las muestras. (#) pegado de los primers

MC1R y ASIP

Los primers fueron diseñados sobre la secuencia del gen MC1R de alpaca disponible en el GenBank (número de acceso EU135880.1). El gen se amplificó con los pares de primers MC1R-A y MC1R-B en dos fragmentos solapados de 626pb y 671pb, respectivamente. Para amplificar las regiones codificantes del gen ASIP se utilizaron tres pares de primers (ASIP-Ex2, ASIP-Ex3 y ASIP-Ex4) diseñados sobre las regiones flanqueantes de cada exón. Para el diseño, se utilizó la secuencia del genoma completo de la alpaca depositado en la base de datos Ensembl (número de acceso ENSVPAG00000009811 - www.ensembl.org). (Tabla 3).

El diseño de todos los pares de primers se llevó a cabo con el programa Primer 3 (Rozen y Skaletsky, 2000).

Tabla 3. Secuencia de primers y T^o de annealing utilizados para amplificar los genes MC1R y ASIP

Nombre	Primer 5' - 3'	Primer 3' - 5'	T ^o annealing
MC1R-A	GCTGCGAAGTGACCAGACTC	GCAGTGCATAGAAGATGGAGATG	57°C
MC1R-B	TGTCCAGCCTCTGCTCTCTG	CTCCTCATTGCCAAGTAACTGC	57°C
ASIP-Ex2	TCCCTCCCTTCCTTGTCTTT	CCACCAGGATTGTTTTGAGG	53°C
ASIP-Ex3	TTGCTTCCGTGTCAGAGGACT	GGGAAACACTGCATTCATCC	53°C
ASIP-Ex4	GGATATCTGGTCGGGAACCT	GAAACCCCTCCTCCTGAAAG	55°C

4.3 Amplificación por PCR y Electroforesis

La amplificación de cada fragmento correspondiente a los genes GH1, MC1R y ASIP se realizó por separado con su correspondiente par de primers (Tabla 2 y Tabla 3, pág. 40), mediante la técnica de PCR en termocicladores programables (PTC-100, MJ Research y Eppendorf Mastercycler® gradient). En la Tabla 4 se detalla la mezcla de reacción utilizada para cada uno de los genes.

Tabla 4. Reactivos utilizados para la mezcla de PCR.

Mezcla de PCR	GH1	MC1R	ASIP
ADN genómico	15 ng	75 ng	75 ng
Agua estéril	c/n ^e	c/n	c/n
Buffer de PCR ^a	1X	1X	1X
Cl ₂ Mg	2 mM ^c	1,5mM	1,5mM ^d
dNTP	0,2 mM	0,2mM	0,2mM
Primers	1uM	1uM	1uM
Taq. Polimerasa ^b	0,9 U	0,63 U	0,63 U
Vol. final	35 µl	25 ul	25 ul

a: (10X buffer 500 mM de KCl, 200 mM de Tris-HCl a pH 8,4)

b: Invitrogen, Carlsbad, CA, USA

c: 1,5mM de Cl₂Mg para GHPromotor y GHE2-4

d: 2mM de Cl₂Mg para ASIP-Ex4

e: cantidad necesaria

El perfil de ciclado para todos los genes incluyó un paso de desnaturalización inicial de 3 min a 94°C seguido de 30-35 ciclos de 1min de desnaturalización a 94°C, 1 min de annealing a 53-57°C, 1 min de elongación a 72°C y una extensión final de 5 min a 72°C.

Para verificar la amplificación, 4 µl de producto de PCR más 2 µl de buffer de carga (azul de bromofenol/xylene cyanol) se sometieron a electroforesis en gel de agarosa al 2% en buffer TAE 1X (0,04 M Tris Base, 57,1 ml Acético glacial, 0,5M EDTA pH8 y agua estéril) seguido de tinción del gel con GelRed™.

4.4 Purificación y Secuenciación

Los productos de PCR se purificaron según el protocolo de precipitación con polietilenglicol (PEG – Anexo pág. 106). El material obtenido se secuenció con un Secuenciador Automático 3730xl (Applied Biosystems, Foster City, USA -

Macrogen Inc Korea) y con los mismos primers que se utilizaron para amplificar los fragmentos por PCR. Los tres genes se caracterizaron secuenciando las dos hebras de ADN.

4.5 Análisis de las secuencias y caracterización de los genes

Los fragmentos obtenidos de los genes **GH1**, **MC1R** y **ASIP** se ensamblaron mediante el uso del software Geneious v4.7 (Drummond y col., 2009) lográndose la secuencia nucleotídica completa de GH1, su promotor, del gen MC1R y la región codificante de ASIP. La identidad de las secuencias se confirmó por homología con secuencias de especies relacionadas con el programa BLAST del NCBI (www.ncbi.nih.gov.edu). El análisis de las mismas, el porcentaje de similitud y la identificación de los elementos regulatorios (de GH1) se realizó mediante un alineamiento de la secuencia de Llama y de especies relacionadas (Tabla 5) con el programa Clustal W (Higgins et al., 1994). Además, los intrones, exones y el sitio de inicio de la traducción (posición +1) de cada gen fueron identificados por comparación con las secuencias de alpaca (Tabla 5). En el caso del gen GH1, los elementos regulatorios fueron corroborados con el programa NSITE (Solovyev et al, 2010) del software SoftBerry (<http://linux1.softberry.com/berry.phtml>) y los fragmentos repetidos en tándem se localizaron mediante el uso del programa Tandem Repeat Finder (Benson, 1999).

Tabla 5. Secuencias del GenBank utilizadas en el análisis

Genes	Nº de acceso del GenBank
GH1	alpaca (DQ782970.1), camello dromedario (AJ575419), ballena (AJ831741), delfín (AJ492191), cerdo (AY727037), vaca (M57764) y oveja (X12546)
MC1R	alpaca (EU135880.1, EU220010.1, FJ517582.2, FJ502230.1 y FJ502229.1), camello bactriano (AB495001), cabra (FM212940.1), oveja (Y13965.1), vaca (AF445641), perro (AF064455.2) y caballo (NM001114534)
ASIP	alpaca (FJ847231.1, HM768322, HM768324), cerdo (JQ839264.1), vaca (X99692.1) oveja (EU420026.1), conejo (FN547134.1) y caballo (NM001164017.1)

La identificación de los polimorfismos se realizó mediante el alineamiento de las secuencias con el software Geneious v.5.5.6 (Drummond y col., 2009). La confirmación del polimorfismo se obtuvo por observación del cambio de base en dos o más animales o por re-secuenciación de la muestra.

En cuanto a la delección del Exón 4 del gen ASIP fue detectada primeramente en geles de agarosa al 2% y para determinar el tamaño de la misma, se secuenciaron los dos patrones de banda única de algunas Llamas.

4.6 Estudio de la diversidad genética

La variabilidad genética se estimó a partir del cálculo de la diversidad nucleotídica π (π), la diversidad haplotípica (H_d) y el número de sitios segregantes (S) mediante el software DnaSP v5 (Librado y Rozas, 2009).

Los haplotipos fueron inferidos a partir de los datos genotípicos obtenidos por secuenciación y el número de los mismos se determinó con el programa Arlequín v3.5.1.2 (Excoffier y Lischer, 2010). Las relaciones entre haplotipos se determinaron construyendo una red con el método de Median-Joining implementado en el software NETWORK v4.6.1.1 (Bandelt y col., 1999).

4.7 Test de neutralidad de Tajima

El estadístico D de Tajima compara diferencias entre los parámetros π (π) y θ (θ). La diversidad nucleotídica (π), es el número de nucleótidos diferentes por sitio entre dos secuencias tomadas al azar (Nei y Li, 1979) y el parámetro θ es igual a $4N_e\mu$ (Kimura, 1968) donde N_e (tamaño efectivo poblacional) y μ (tasa de mutación). Debido a que es difícil determinar con exactitud N_e y μ , se estima de manera indirecta θ_w (θ_w theta de Watterson). Este parámetro está basado en el número total de sitios segregantes en un grupo de secuencias, donde $\theta_w = K/a$, “ K ” es igual al número total de sitios segregantes (polimorfismos) en una muestra de secuencias dada y “ a ” es igual al número de secuencias de la muestra (Watterson, 1975; Tajima, 1983). La relación existente entre ambos parámetros permite determinar si las secuencias se encuentran bajo el modelo neutral o se desvían del mismo. Si ambos parámetros dan el mismo resultado quiere decir que el polimorfismo observado es neutro y se encuentra distribuido aleatoriamente. En

cambio, si existen diferencias entre ambos quiere decir que la selección esta afectando alguno de ellos promoviendo su incremento o disminución (Castillo Cobián 2007).

La D de Tajima se calcula a partir de la siguiente ecuación:

$$D = \frac{\pi - \theta}{\sqrt{V(\pi - \theta)}}$$

reemplazando θ por θ_w se obtiene:

$$D = \frac{\pi - K/a}{\sqrt{V(\pi - K/a)}}$$

Si el valor D es negativo, indica la presencia de mutaciones raras o poco frecuentes; lo que sugiere la participación de selección direccional o positiva. En cambio, si D resulta positivo significa que algunos alelos son más comunes que lo esperado sugiriendo la actuación de selección balanceadora. Si D es igual a cero, no existe diferencia alguna entre π y θ , por lo tanto están en condiciones neutrales (Castillo Cobián 2007). El valor D de Tajima fue calculado mediante el software DnaSP v5 (Librado y Rozas, 2009).

4.7.1 Test de McDonald-Kreitman

Para detectar selección positiva se utilizó el test de McDonald y Kreitman (1991). Este test compara la cantidad de variación dentro de una especie (polimorfismo) con la divergencia entre especies emparentadas (sustituciones) en dos tipos de sitios, neutrales (sinónimos) y no neutrales (no-sinónimos). Para ello se construye una tabla de contingencia de 2x2 donde se evalúa el número de sustituciones sinónimas (s_F) y no-sinónimas (n_F) fijadas entre especies, y el número de polimorfismos sinónimos (s_P) y no-sinónimos (n_P) dentro de la especie.

Si la evolución es puramente neutral entonces $(n_F)/(s_F) = (n_P)/(s_P)$. Sin embargo, si la relación n_F/s_F es significativamente mas alta que n_P/s_P sugiere la acción de selección positiva. Por el contrario, si n_F/s_F es significativamente mas bajo que

n_P/s_P sugiere que la selección purificadora estuvo operando para reducir el número de sustituciones no-sinónimas entre las especies. Este razonamiento depende de la suposición de que la tasa de mutación sinónima sigue siendo la misma durante todo el proceso evolutivo (Nei y Kumar, 2000). El test de McDonald-Kreitman se calculó con el software DnaSP v5 (Librado y Rozas, 2009).

4.8 Detección de selección positiva utilizando sustituciones sinónimas (d_S) y no-sinónimas (d_N)

Otro método para detectar selección positiva a nivel molecular es mostrar que d_N es significativamente mayor que d_S . Donde d_N es el número de sustituciones no-sinónimas por sitio no sinónimo (es decir sustituciones que provocan cambio de aminoácido) y d_S es el número de sustituciones sinónimas por sitio sinónimo (sin cambio de aminoácido en la secuencia) (Castillo Cobián 2007). La relación d_N y d_S se aplica con frecuencia a una muestra de secuencias de un mismo grupo y representan polimorfismos segregantes. El cálculo del número de sustituciones sinónimas y no sinónimas por sitio se realizó con el software MEGA v5 (Tamura y col., 2011).

4.9 Definición de alelos

Inicialmente, los alelos de los genes **MC1R** y **ASIP** fueron definidos teniendo en cuenta todos los SNPs encontrados. Sin embargo, para el estudio de su asociación con los fenotipos de color, se seleccionaron aquellos con posible importancia funcional, de acuerdo a la presencia de cambios no sinónimos y a la frecuencia de aparición en el total de la muestra.

En el caso del Exón 4 del gen ASIP que presentó dos polimorfismos en región codificante, en un principio, se decidió tipificar la delección porque resultó mejor candidato.

4.10 Análisis de los genotipos de MC1R y ASIP en los colores de capa seleccionados.

Los animales se separaron en cuatro grupos de acuerdo a su color de capa, basados en la clasificación de colores para Llamas argentinas definida por Frank y colaboradores (2001, 2006a) y luego se tipificaron.

Mientras que para el gen MC1R se utilizó en este estudio el primer fragmento amplificado con el par de primers MC1R-A, para el gen ASIP se amplificaron los 3 fragmentos con los primers ASIP-Ex2, ASIP-Ex3 y ASIP-Ex4.

A-Animales marrón rojizo con cara y/o extremidades negras (MCN= “Cara Negra”; N=19) (Fig. 6a)

B-Animales que presentan capa negra con sus variantes o capa marrón oscuro (“Tapado oscuro”-TO; N=19) (Fig. 6 b y c)

C-Animales que presentan la capa marrón rojiza o castaño (“Tapado claro”-TC; N=17) (Fig. 6d)

D-Animales totalmente blancos que no presenta ningún tipo de pigmentación ni mancha (“Blanco no albino”-BNA; N=29) (Fig. 6e)

Además, se tipificaron Llamas grises (N=3) que luego para el análisis fueron incluídas dentro del grupo eumelánico. Se seleccionaron 7 guanacos para el gen MC1R y 5 para ASIP, de Santa Cruz y Río Negro, para determinar su secuencia nucleotídica y describir el genotipo silvestre. Las hipótesis de asociación entre los genotipos y los colores de capas se probaron usando una Tabla de contingencia de 2 X 2 mediante un test exacto de Fisher. Las diferencias entre las comparaciones por pares se calcularon con un nivel de significancia de 0,05. El método de Bonferroni se utilizó para corregir el nivel de significancia luego de que se realizaran múltiples comparaciones.

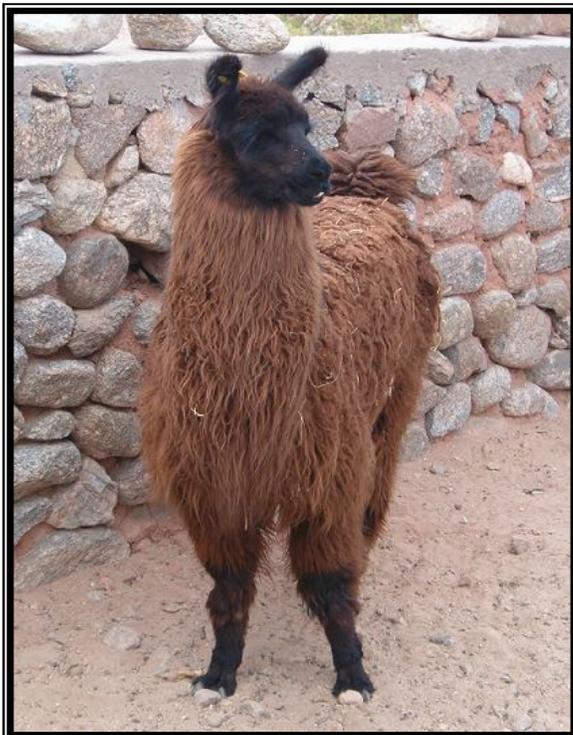


Fig. 6a. Fenotipo: Marrón rojizo con cara y extremidades negras (MCN)



Fig. 6b. Fenotipo: Tapado Oscuro (TO)



Fig. 6c. Fenotipo: Negro (TO)

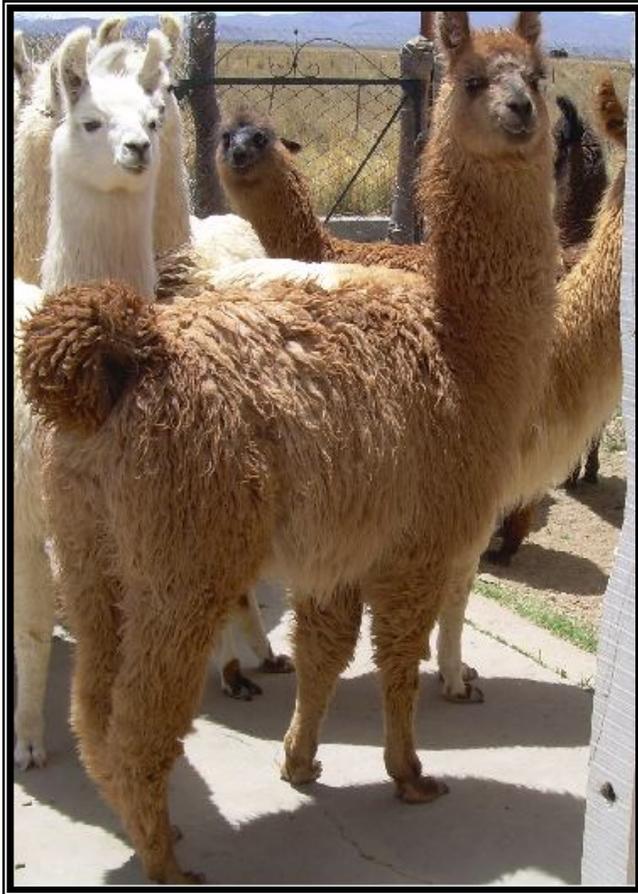


Fig. 6d. Fenotipo: Tapado Claro (TC)

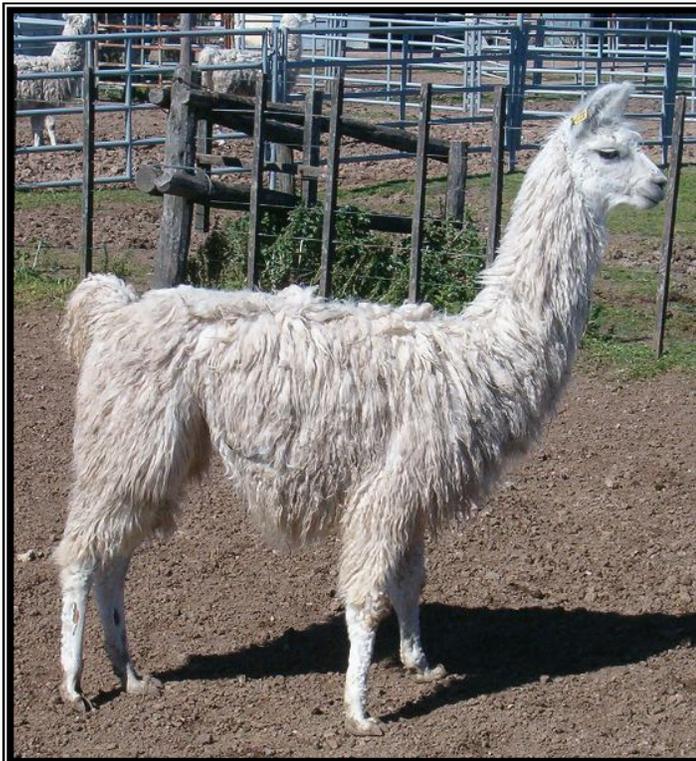


Fig. 6e. Fenotipo: Blanco no Albino (BNA)

4.11 Predicción de estructura secundaria de la proteína MC1R y efecto del cambio de un aminoácido por otro en la estructura/función.

Para predecir el número de hélices transmembrana y la topología de la proteína MC1R se utilizó el software HMMTOP 2.0 (**H**idden **M**arkov **M**odel for **T**opology **P**rediction). Este método se basa en la hipótesis de que la localización de los segmentos transmembrana y la topología son determinadas por la diferencia en la distribución de aminoácidos en diferentes partes estructurales de la proteína en vez de por la composición específica de aminoácidos en esas partes. Para ello el software utiliza un modelo oculto de Markov con una arquitectura especial para buscar topología transmembrana correspondiente a la máxima probabilidad entre todas las topologías posibles de una proteína dada. (Tusnády y Simon, 1998).

La visualización de la estructura en 2D de la proteína MC1R se realizó mediante la aplicación web llamada Protter (<http://wlab.ethz.ch/protter>). Esta aplicación permite visualizar la secuencia, topología y anotaciones de las proteínas (Protter - Omasits y col., 2013). Protter es compatible con numerosos formatos de archivos proteómicos y automáticamente se integra a varias bases de datos de proteínas de referencia.

La probabilidad de que un SNP no sinónimo (cambio de aminoácido) que conforman los alelos provoque un impacto funcional en la proteína de MC1R y ASIP fue obtenida con el programa PANTHER (**P**rotein **A**nalysis **T**hrough **E**volutionary **R**elationships).

PANTHER es una base de datos que contiene una colección de familias y subfamilias de proteínas. Este programa predice con que frecuencia un determinado aminoácido ocurre en una posición dada dentro de una familia de proteínas relacionadas evolutivamente entre diferentes especies (Mi y col., 2007). La probabilidad de que una variante dada provoque un efecto deletéreo en la función de la proteína es estimada a través del P deletéreo (P_{del}) de tal manera que un valor de subPSEC (estima la probabilidad del efecto funcional de la sustitución de un aminoácido) de -3 corresponde a un P_{del} de 0,5 (Brunham y col., 2005). El valor de subPSEC es el logaritmo natural de la relación de probabilidad del aminoácido silvestre (wild type) y del mutante en una posición particular. Los valores de subPSEC dados por PANTHER son continuos de 0 (neutro) hasta -10 (más probable que sea deletéreo).

RESULTADOS

5.1 GEN GH1

5.1.1 Caracterización del gen

La secuencia completa del gen GH1 de Llama y su promotor fueron depositadas en la base de datos de secuencias genéticas del GenBank con número de acceso HM921333 (Fig. anexa 1, Pág. 106). La misma tiene una longitud de 1991pb y está constituida por cinco exones y cuatro intrones de diferente tamaño (Fig. 7).

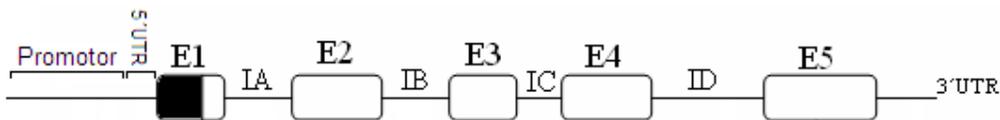


Fig. 7: Esquema de la organización estructural del gen GH1 de Llama. Los rectángulos representan los exones (E1-E5), las líneas los intrones (IA-ID), las regiones no traducibles (5'UTR y 3'UTR) y el promotor. La zona sombreada del exón 1 simboliza la secuencia del gen que no se traduce.

Las uniones entre los exones e intrones cumplen la regla GT-AG (Breathnach y Chambon, 1981) que corresponde a los sitios de corte y empalme para el procesamiento del ARN.

Los exones del gen GH1 en la Llama poseen el mismo tamaño que en las especies comparadas. El exón 1, contiene una región comprendida entre -60 y -1, que se transcribe pero no se traduce. Los intrones también son conservados en cuanto a su longitud, excepto el intrón C. En la Llama, el intrón C es 81pb más corto que el de dromedario y posee dos repetidos imperfectos de 21pb cada uno 5'GGCGGCGGCGGGTGATGGGAT3' - 5'GGCGGCGGAGGATGGTGGGTT3'.

La secuencia codificante tiene un porcentaje de similitud de 99,1% con las de alpaca y dromedario. Asimismo, con las especies de cetartiodáctilos comparadas tales como ballena, delfín, cerdo, vaca y oveja, el rango del porcentaje de similitud fue de 96,5% para ballena - 90,3% para oveja.

Cuando se comparó la región codificante de los Camélidos (Llama, alpaca y dromedario) con los cetartiodáctilos, se identificaron 12 sustituciones propias de

los Camélidos, de las cuales 3 resultaron en cambios no-sinónimos (c.61A>C, c.71T>C y c.491A>G).

Los intrones son menos conservados con porcentajes de similitud que varían en promedio 81,9% con dromedario, 67,8% con ballena y delfín, 67,62 con oveja y vaca y 62,15% con cerdo.

Promotor y regiones 5' UTR y 3' UTR

A partir del codón de inicio (ATG), 330pb aguas arriba pertenecen a la región 5'UTR, la región del promotor proximal y sus elementos regulatorios. Por otra parte, luego del codón de stop, 88pb corresponden a la región 3'UTR que contiene un sitio potencial de poliadenilación AATAAA.

Se identificaron los elementos regulatorios (Tabla 6) por homología de secuencias con las de otras especies de mamíferos y con el programa NSITE (Solovyev et al, 2010).

De esta manera se encontraron 2 sitios adicionales de unión: el receptor de hormona tiroidea (T3R) y Zn15, factor de transcripción que activa la expresión del gen GH1, llamado así por 15 dedos de zinc que son responsables de la unión del promotor de GH1 (VanderHeyden y col., 2000).

Tabla 6. Posición y secuencia de los elementos regulatorios identificados

Elemento regulatorio	Posición	Secuencia
Caja CAAT	-69 a -65	CCAAT
T3R	-95 a -80	CAGGCATAAAAAGGGC
Caja TATA	-91 a -84	CATAAAAA
p-Pit-1	-147 a -132	CATGCATAAATGTATA
Zn15	-168 a -150	AGCACAGGCCGGTCAGCGG
CRE	-158 a -154	GGTCA
d-Pit-1	-187 a -166	AGGTTCTAAATTATCCATTA
NRE	-176 a -167	TATCCATTA
Sp1	-198 a -184	TGAGTGGGAGGAGGT
TRE	-233 a -218	GGGGACATGACCCAG

Referencias Tabla 6: T3R=elemento del receptor de hormona tiroidea; p-Pit-1= sitio de unión proximal para el factor de transcripción Pit-1; Zn15=factor de transcripción; CRE=elemento de respuesta a AMP cíclico; d-Pit-1=sitio de unión distal para el factor de transcripción Pit-1; NRE=elemento regulatorio negativo; Sp1=elemento Sp1; TRE=elemento de respuesta a tiroides.

Una parte de la región promotora de GH1 de la ballena, el delfín, el dromedario y la alpaca usadas en este estudio no se encontraron disponibles en el GenBank por lo cual no fue posible comparar algunos de los elementos regulatorios con los de Llama.

La mayoría de los promotores tienen una secuencia denominada caja TATA, que normalmente está situada 25pb por delante del punto de inicio y constituye un componente modular del promotor (Lewin B, 1994). En la caja TATA de la Llama se identificó una sustitución g.240T>C en la primera base. Este mismo cambio había sido descrito previamente en alpaca y dromedario por Maniou y colaboradores (2004) pero difiere de las publicadas para otros mamíferos.

La caja CAAT, TRE, d-Pit-1 y NRE mostraron 100% de homología con las especies comparadas. Además p-Pit-1 difiere en una base con respecto a la vaca y la oveja. La región correspondiente al elemento CRE es conservado en la Llama pero difiere de las otras especies. Por último, Sp1, Zn15 y T3R presentaron un porcentaje de similitud menor con las de las otras especies, diferenciándose por 2 y 4 sustituciones.

5.1.2 Diversidad genética de GH1

Se analizó la variabilidad de la secuencia completa en 23 Llamas. Se encontraron 15 SNPs con distribución desigual a lo largo del gen (Fig. 8).

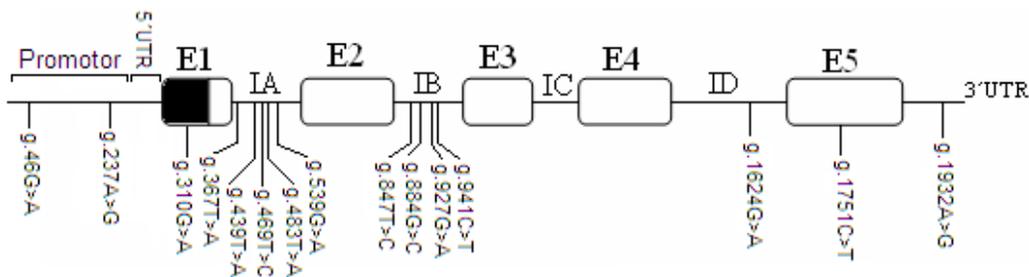


Fig. 8: Esquema de la distribución de los SNPs en el gen GH1 de Llama. Los números de SNPs hacen referencia a la ubicación en la secuencia genómica "g."

La mayoría de los SNPs identificados están localizados en las regiones no codificantes, principalmente en los intrones A y B, y solamente un SNP en el intrón D. No se detectaron variantes en el intrón C, así como tampoco en los exones 2, 3 y 4. En los exones 1 y 5 se encontraron dos polimorfismos, uno en

cada exón. El SNP del exón 5 corresponde a una sustitución sinónima T/C. En la región 3'UTR también se identificó un SNP.

En el promotor se encontraron dos polimorfismos, g.46G>A y g.237A>G. El primero está ubicado a 46pb del primer nucleótido de la secuencia genómica y el segundo en las cercanías de la caja TATA.

La ubicación de los polimorfismos y sus frecuencias alélicas se muestran en la Tabla 7. En la misma se observa que todos los SNPs presentaron frecuencias alélicas mayores a 0,06.

Tabla 7. Ubicación de los SNPs y frecuencias alélicas

SNP	Frecuencias alélicas
g.46G>A	0,891/0,109
g.237A>G	0,587/0,413
g.310G>A	0,848/0,152
g.367T>A	0,804/0,196
g.439T>A	0,935/0,065
g.469T>C	0,543/0,457
g.483T>A	0,848/0,152
g.539G>A	0,913/0,087
g.847T>C	0,913/0,087
g.884G>C	0,543/0,457
g.927G>A	0,935/0,065
g.941C>T	0,543/0,457
g.1624G>A	0,609/0,391
g.1751C>T	0,804/0,196
g.1932A>G	0,522/0,478

Con respecto a los polimorfismos del promotor, se encontró que el SNP g.237A>G está ubicado dentro de la secuencia que pertenece a T3R. El SNP g.46G>A se encontró distante del resto de los elementos regulatorios descriptos.

Considerando los 15 sitios segregantes (S) identificados se infirieron 15 haplotipos (h) diferentes con una frecuencia de fase $>0,9$. En la Tabla 8 se observa la definición de cada uno y su frecuencia. Se encontró un valor de diversidad haplotípica alto ($H_d=0,909 \pm 0,023$) y se observaron numerosos singletons (visto una sola vez en la muestra).

Tabla 8. Definición de los haplotipos de GH1

Nº Hapl.	Definición del Haplotipo														
	46	237	310	367	439	469	483	539	847	884	927	941	1624	1751	1932
H1 (6)	G	G	G	T	T	C	T	G	T	C	G	T	A	T	A
H2 (7)	G	G	G	T	T	C	T	G	T	C	G	T	A	C	A
H3 (2)	G	G	G	T	T	C	T	G	T	C	G	T	G	C	A
H4 (5)	G	A	A	T	T	T	T	G	T	G	G	C	G	C	G
H5 (2)	G	A	G	T	T	T	T	G	C	G	G	C	G	C	A
H6 (1)	G	G	G	T	T	C	T	G	T	C	A	T	A	T	A
H7 (1)	G	G	G	T	T	C	T	G	T	C	A	T	A	C	A
H8 (1)	G	A	G	A	A	T	T	A	T	G	G	C	G	C	G
H9 (6)	G	A	G	T	T	T	T	G	T	G	G	C	G	C	G
H10 (2)	A	A	G	T	T	T	T	G	T	G	G	C	G	C	G
H11 (1)	A	A	G	T	T	C	T	G	T	G	G	C	G	C	G
H12 (1)	G	G	G	T	T	C	T	G	T	C	G	T	A	T	G
H13 (1)	G	A	G	A	T	T	T	G	C	G	G	C	G	C	A
H14 (1)	G	A	G	A	T	T	A	A	T	G	G	C	G	C	G
H15 (1)	G	A	G	T	T	C	A	G	T	C	G	T	A	T	A

() se muestra la frecuencia absoluta de los haplotipos

La diversidad nucleotídica total estimada para GH1 fue $\pi = 0,00223 \pm 0,00012$ y la correspondiente a la región codificante fue $\pi = 0,00057 \pm 0,00011$.

El Test de Tajima dio un valor de $D = 0,82079$, no significativo (P valor $> 0,10$) por lo que la hipótesis de neutralidad no puede ser descartada.

5.1.3 Estructura primaria de la proteína de GH1

La secuencia obtenida del gen GH1 codifica un péptido de 191 aminoácidos (Fig. 9) con un porcentaje de similitud que varía desde un 97,2% con la ballena a 87,5% con la oveja. La secuencia fue 100% homóloga a la de alpaca. En las posiciones 52, 164, 181 y 189 la proteína contiene 4 residuos de cisteína

conservados en otras especies que son los que participarían en la formación de puentes disulfuros. (Abdel-Meguid y col., 1987).

```

      péptido señal
      ────────────+1
MAAGPRTSMLLAFTLLCLPWPQEAGÁFFAMPLSSLFANAVLRAQHLHQLAADTYKEFER TY IPE
GQRYSIQNAQA AFCFSETIPAPT GKDEAQQRSDVELLRFSLLLIQSWLGPVQFLSRVFTNSLVFGT
SDRVYEKLDLEEGIQALMRELEDGSPRAGQILRQTYDKFDTNLRSDDALLKNYGLLSCFKKDL
HKAETYL RVMKCRRFV ESSCAF

```

Fig. 9. Secuencia de la proteína de GH1 de Llama. La barra representa el péptido señal, el aminoácido +1 representa el inicio de la proteína madura.

La Llama posee la misma secuencia de aminoácidos que forma las cuatro alfa hélices en el cerdo (Abdel-Meguid y col., 1987).

En el péptido señal (26aa), la Llama y alpaca difieren del dromedario en un solo sitio (p.M-18V). Otros dos cambios (p.P-6T y p.A-3V) en esta misma región diferencian la GH1 de los Camélidos del resto de los cetartiodáctilos comparados (Fig. 10).

La proteína madura (191aa) de la Llama, alpaca y dromedario son 100% homólogas. La sustitución p.R138 es propia de los Camélidos y difiere del resto de las especies (p.K138).

		-18		-6	-3	
alpaca	:	MAAGPRTSM	LLAFTLLCLPWPQEAGA	:	26	
llama	:	MAAGPRTSM	LLAFTLLCLPWPQEAGA	:	26	
drcmedario	:	MAAGPRTSV	LLAFTLLCLPWPQEAGA	:	26	
vaca	:	MAAGPRTSL	LLAFALLCLPWTQVVGA	:	26	
oveja	:	MAAGPRTSL	LLAFTLLCLPWTQVVGA	:	26	
cerdo	:	MAAGPRTSV	LLAFALLCLPWTQEVGA	:	26	
delfin	:	MAAGPRTSM	LLAFALLCLPWTQEVGA	:	26	
ballena	:	MAAGPRTSM	LLAFALLCLPWTQEVGA	:	26	

Fig. 10. Alineamiento de la región del péptido señal de GH1. -18 es el sitio de sustitución aminoacídica entre las especies de camélidos.

5.2 GEN RECEPTOR 1 DE MELANOCORTINA (MC1R)

5.2.1 Caracterización del gen y estudio de su diversidad

La región codificante del gen MC1R de Llama consta de un único exón de 954pb. La secuencia obtenida de este gen incluyó además dos fragmentos de 123pb y 91pb que corresponden respectivamente, a las regiones 5' y 3' no traducidas (5'UTR y 3'UTR) (Fig. 11). El porcentaje de similitud con la secuencia de alpaca fue de 98,95%, mientras que para el resto de las especies comparadas fue desde 84.38% con perro hasta 96.96% con dromedario.

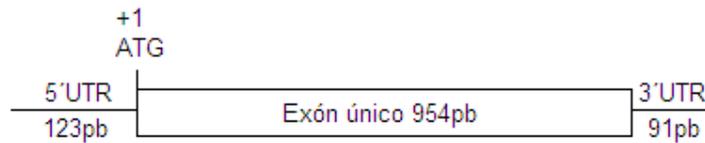


Fig. 11. Organización estructural del gen MC1R de Llama. La posición +1 corresponde al sitio de inicio de la traducción.

El gen MC1R resultó altamente variable en Llamas. Según su distribución en el gen, se localizaron 13 SNPs en la región codificante y uno en la región 3'UTR. De estas sustituciones, 10 resultaron no sinónimas produciendo un cambio en el aminoácido codificado.

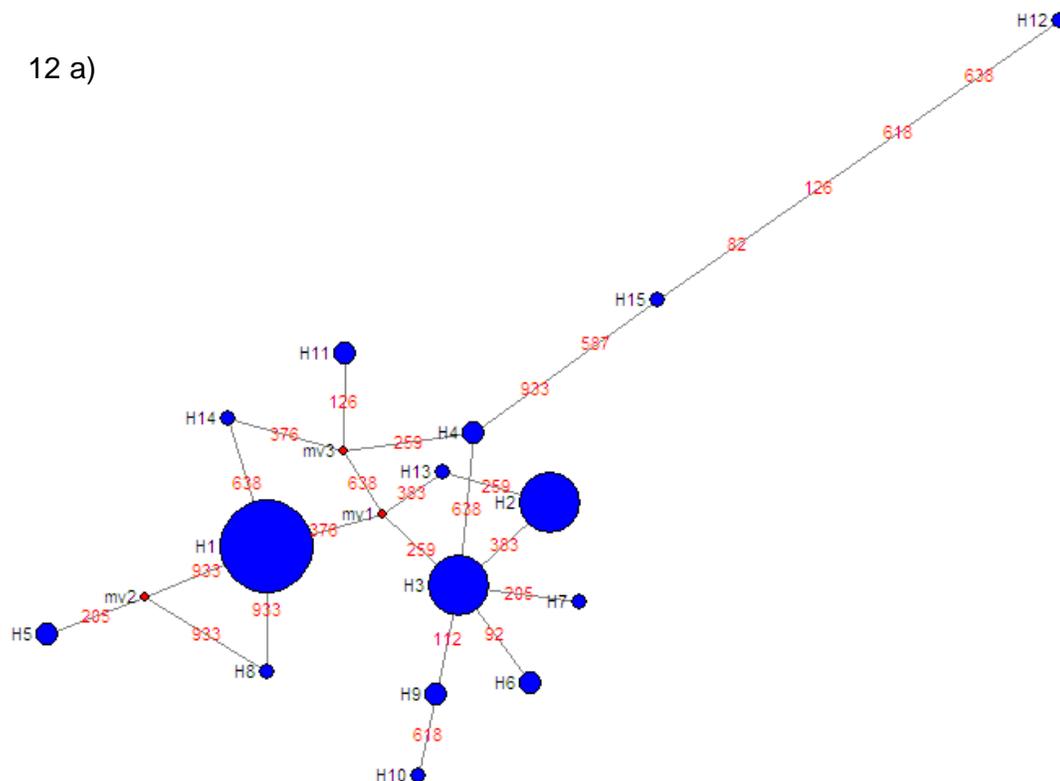
La Tabla anexa 1 (en pág. 109) muestra la ubicación de los SNPs y sus frecuencias alélicas. Todos los SNPs presentaron una frecuencia mayor a 0,01. Los polimorfismos en los sitios 259, 376 y 383 fueron los que mostraron las frecuencias más altas. A diferencia del resto, los SNPs ubicados en los sitios 205 y 638 fueron descriptos sólo en Llamas, no habiéndose reportado previamente en alpacas (Powell y col., 2008; Feeley y col., 2009; Guridi y col., 2011, Bathrachalam y col., 2011).

A partir de los SNPs identificados se infirieron 15 haplotipos con una frecuencia de fase >0.9

La diversidad nucleotídica estimada para la región codificante fue de $\pi= 0,00204 \pm 0,00017$ mientras que la diversidad nucleotídica total fue $\pi=0,00177 \pm 0,00016$. La diversidad haplotípica total fue $Hd=0,762 \pm 0,037$.

Para estudiar las relaciones entre los haplotipos, inicialmente se construyó una red basada en la información de las 15 variantes identificadas (Fig. 12a) En la misma se observan 3 haplotipos mayoritarios conectados a través de una serie de reticulaciones con otros de menor frecuencia, y además, la presencia de dos haplotipos H12 y H15, separados de los principales por varios pasos mutacionales.

Con el fin de esclarecer las relaciones entre haplotipos, se construyó una nueva red excluyendo los singletons (Fig 12b). De esta manera, se observó que a partir de H3 se originan la mayoría de los haplotipos y se estableció por comparación con la secuencia de guanaco, que éste corresponde al nodo ancestral. Claramente se distingue como se originan los haplotipos mayoritarios, derivando H1 de H3 por dos pasos mutacionales (259 y 376) y H2 por un solo paso (383).



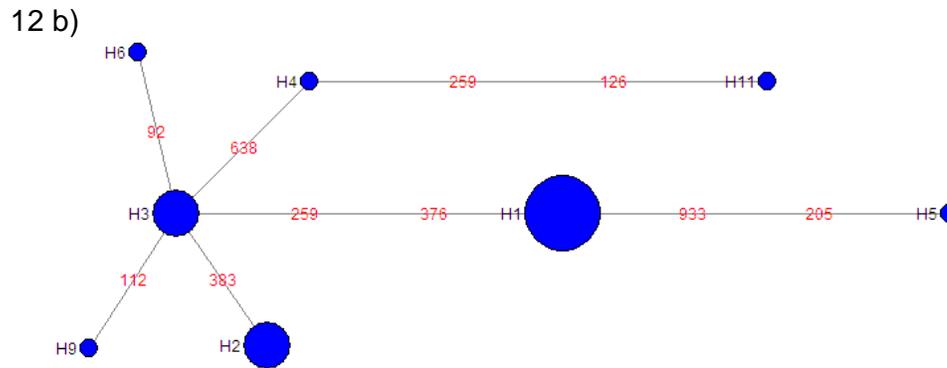


Fig. 12. Relaciones haplotípicas del gen MC1R. a) con $h=15$ haplotipos. b) excluyendo los singletons. Los números en rojo indican la posición del SNP (pasos mutacionales). Los nodos azules simbolizan a cada variante. El tamaño del nodo es proporcional a la frecuencia haplotípica absoluta de los datos obtenidos. Los nodos rojos indican secuencias no muestreadas que posiblemente existan y sean necesarias para construir el vínculo.

En la Tabla 9, se muestra la definición de los haplotipos y las sustituciones de aminoácidos producidas. Como puede observarse, del total de SNPs identificados, solo las sustituciones c.126T>C, c.618G>A y c.933G>A fueron sinónimas. En particular, los tres haplotipos principales H1, H2 y H3, se diferencian entre sí por tres sustituciones no sinónimas consecutivas, localizadas en un fragmento de 125 pb.

Tabla 9. Definición de los haplotipos de MC1R

Haplotipo	Definición del haplotipo											
	82	92	112	126	205	259	376	383	587	618	638	933
	T28A	T31M	V38M	D42D	L69M	V87M	G126S	M128T	F196S	L206L	R213Q	E311E
H1 (33)	A	C	G	T	C	A	A	T	T	G	G	G
H2 (14)	A	C	G	T	C	G	G	C	T	G	G	G
H3 (14)	A	C	G	T	C	G	G	T	T	G	G	G
H4 (2)	A	C	G	T	C	G	G	T	T	G	A	G
H5 (2)	A	C	G	T	A	A	A	T	T	G	G	G
H6 (2)	A	T	G	T	C	G	G	T	T	G	G	G
H7 (1)	A	C	G	T	A	G	G	T	T	G	G	G
H8 (1)	A	C	G	T	C	A	A	T	T	G	G	A
H9 (2)	A	C	A	T	C	G	G	T	T	G	G	G
H10 (1)	A	C	A	T	C	G	G	T	T	A	G	G
H11 (2)	A	C	G	C	C	A	G	T	T	G	A	G
H12 (1)	G	C	G	C	C	G	G	T	C	A	G	A
H13 (1)	A	C	G	T	C	A	G	C	T	G	G	G
H14 (1)	A	C	G	T	C	A	A	T	T	G	A	G
H15 (1)	A	C	G	T	C	G	G	T	C	G	A	A

5.2.2 Tests de selección

La posible influencia de selección en el locus MC1R se examinó mediante el test de Tajima pero el valor obtenido de $D = -0,67838$ no fue estadísticamente significativo ($p > 0.1$).

Además, se aplicó el test de McDonald-Kreitman (MK), que compara la cantidad de variación dentro de una especie con la divergencia entre las especies. Para ello, se secuenció el gen MC1R en 10 guanacos y se alineó con las secuencias de Llamas.

Utilizando este test, tampoco se encontraron evidencias de la existencia de evolución no neutral.

Como se observa en la tabla de contingencia (Tabla 10), no se encontraron sustituciones fijadas entre especies.

Tabla 10. Tabla de contingencia correspondiente al Test MK

MC1R	Diferencias fijadas entre especies	Sitios polimórficos
Sustituciones sinónimas	0	3
Sustituciones no sinónimas	0	9

Sin embargo, cuando se estimaron las tasas de sustitución no sinónimas ($dN = 0,0012 \pm 0,0006$) en Llamas resultaron mucho mayores que las sinónimas ($dS = 0,0003 \pm 0,0002$).

5.2.3 Estudio de las variantes alélicas del gen MC1R en los distintos grupos de color

Para simplificar el análisis de la relación entre las variantes alélicas y los fenotipos observados, se excluyeron los cambios sinónimos y aquellos que presentaron una frecuencia del alelo minoritario menor a 0.10. De esta manera, los alelos estudiados del MC1R quedan conformados por los SNPs 259; 376 y 383.

Se analizó el fragmento de interés en un total de 87 muestras agrupadas de acuerdo al color de capa.

Como se muestra en la Tabla 11, se obtuvieron en total seis variantes alélicas que se denominaron MC1R*1-6. Los alelos MC1R*1, MC1R*2 y MC1R*3 fueron los mayoritarios con una frecuencia de 0,437, 0,264 y 0,277 respectivamente, mientras que MC1R*4, MC1R*5 y MC1R*6 se observaron sólo una o dos veces.

Tabla 11. Frecuencias haplotípicas de los alelos del MC1R obtenidas con los 3 SNPs

Alelos	Definición			Frec. Haplot.
	259	376	383	
MC1R*1	A	A	T	76
MC1R*2	G	G	C	46
MC1R*3	G	G	T	48
MC1R*4	G	A	T	2
MC1R*5	A	G	T	1
MC1R*6	A	G	C	1

Cuando se analizó la distribución de estos alelos entre los grupos de color de capa (Fig. 13), se observó que la misma fue significativamente diferente ($P < 0,0001$)

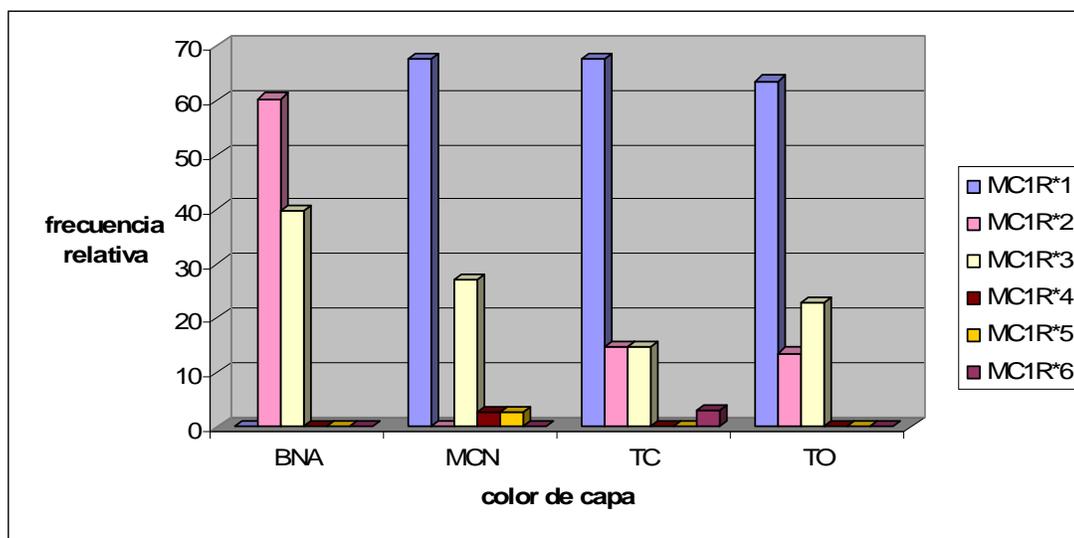


Fig 13. Distribución de los alelos del gen MC1R por grupo de color de capa. La referencia de los alelos MC1R*1, MC1R*2, MC1R*3, MC1R*4, MC1R*5 y MC1R*6 se encuentra a la derecha del gráfico. BNA=blanco no albino. MCN=cara negra. TO=tapado oscuro. TC=tapado claro.

MC1R*2 fue el alelo más frecuente en el grupo de Llamas BNA. Este alelo también apareció aunque con frecuencias muy bajas en los grupos TC y TO. Por el contrario, no se encontró en los animales con patrón MCN. En este grupo, así como también en TC y TO, la variante más frecuente fue MC1R*1. Esta variante no se observó en ninguno de los animales con fenotipo BNA.

El alelo silvestre, representado por MC1R*3, estuvo presente en todos los grupos de color de capa, aunque en mayor número en las Llamas BNA.

Cuando se analizaron las combinaciones alélicas presentes (Fig.14), también se observó que las frecuencias genotípicas fueron significativamente diferentes entre los distintos grupos ($P < 0,0001$). En particular, se encontraron diferencias significativas cuando se comparó el grupo BNA con cada uno de los grupos restantes, incluso luego de aplicar la corrección de Bonferroni.

Los alelos MC1R*4, MC1R*5 y MC1R*6 no fueron considerados para las relaciones con los distintos fenotipos porque presentaron frecuencias muy bajas en el total de muestras estudiadas.

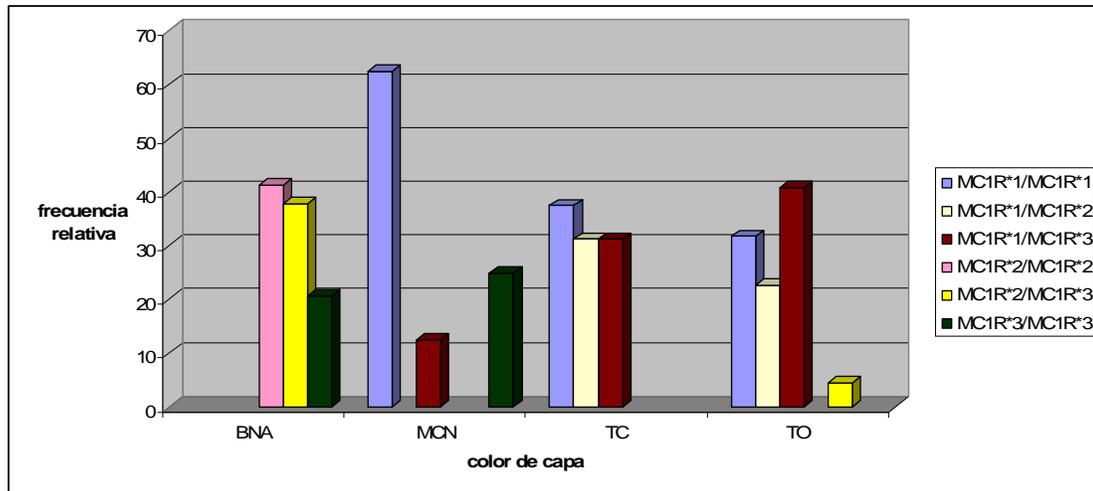


Fig 14. Distribución de las combinaciones alélicas del gen MC1R. La referencia de los genotipos se encuentra a la derecha del gráfico. BNA=blanco no albino. MCN=cara negra. TC=tapado claro. TO=tapado oscuro

La mayoría de los animales con fenotipo MCN, TC y TO presentaron en sus genotipos al menos una copia del alelo MC1R*1, mostrando una asociación entre el mismo y la capa pigmentada ($p < 0,0001$).

El 41,4% de las Llamas con fenotipo BNA tuvieron genotipo homocigota para el alelo MC1R*2. Esta combinación no se repitió en ninguno de los grupos pigmentados. Además el genotipo MC1R*2/MC1R*3 estuvo presente en las Llamas blancas y en muy baja frecuencia en aquellas con fenotipo TO. Ambos genotipos mostraron una asociación significativa con la ausencia de pigmentación ($p < 0.0001$)

Además, se observó el genotipo silvestre MC1R*3/MC1R*3 en animales con fenotipo BNA y MCN.

A diferencia de lo que ocurre en otras especies, los genotipos del MC1R no permitieron diferenciar fenotipos eumelánicos de los feomelánicos.

5.3 PÉPTIDO DE SEÑALIZACIÓN *Agouti* (ASIP)

5.3.1 Caracterización del gen y estudio de su diversidad

Previo a la búsqueda de polimorfismos, se caracterizó el gen ASIP mediante secuenciación de la región codificante y parte de las regiones intrónicas contiguas a la misma. La región codificante estuvo compuesta por el Exón 2 (160 pb), Exón 3 (65pb) y Exón 4 (177pb), respectivamente y mostró un alto grado de conservación entre especies. Los porcentajes de similitud variaron desde 99,25% con alpaca hasta el 85,60% con conejo.

El patrón de variabilidad de este gen en Llamas fue muy diferente al observado para MC1R. Se identificaron 8 polimorfismos que se localizaron principalmente en los intrones, mientras que en la región codificante se localizaron dos, un SNP (c.292C>T) y una delección que pudo observarse en geles de agarosa (Fig. 15).

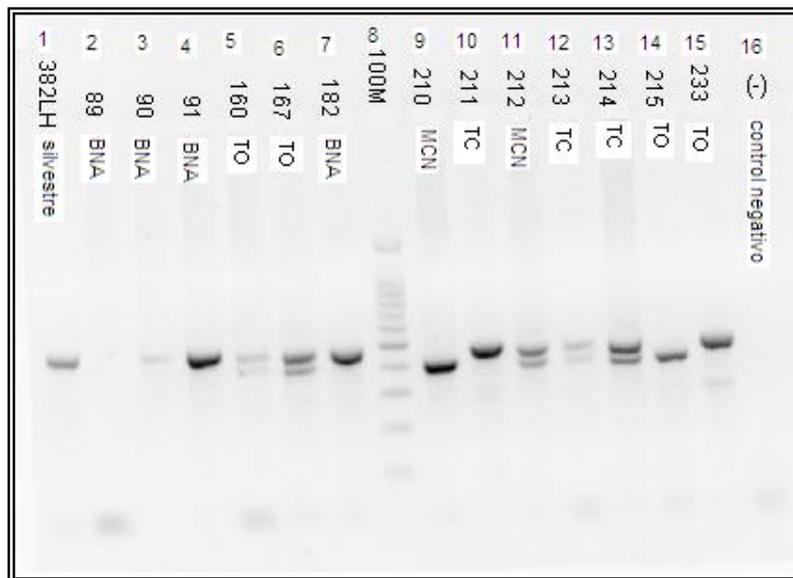


Fig. 15. Tipificación de la delección del Exón 4 de las Llamas en gel de agarosa. El tamaño del producto amplificado sin delección fue de 400pb y el del producto amplificado delecionado fue de aproximadamanente 343pb. Calles 1, 3, 4, 7, 10 y 15: muestras homocigotas sin la delección. Calles: 9 y14: homocigotas para la delección. Calle 5, 6, 11, 12 y 13: heterocigotas para la delección. Calle 8: marcador de peso molecular. Calle 16: control negativo.

La determinación del tamaño del fragmento deletado se realizó por secuenciación (Fig. anexa 2, Pág 109) de los dos patrones de banda única. Se encontró que el mismo corresponde a una delección de 57 pb que abarca desde la posición 325 a la 381 en la secuencia codificante. La organización del gen ASIP y sus polimorfismos se muestra en la Figura 16.

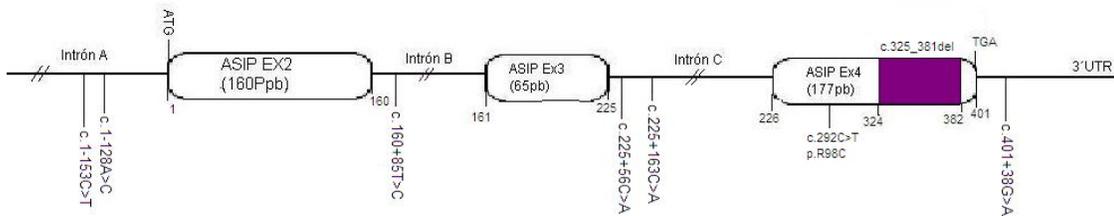


Fig. 16. Organización estructural del gen ASIP de Llama. Al sitio de inicio de la traducción (ATG) se le asignó la posición +1. La delección del Exón 4 está sombreada en color violeta. Los números de SNPs del exón 4 hacen referencia a la ubicación en la secuencia codificante "c."

La diversidad nucleotídica total π fue $0,00255 \pm 0,00015$ y la de la región codificante $0,00191 \pm 0,00023$. Se identificaron 5 haplotipos dentro de los cuales H1 y H3 fueron los mayoritarios con una frecuencia de 0,526 y 0,342, respectivamente. La diversidad haplotípica ($Hd=0,642 \pm 0,054$) resultó mas baja que para MC1R ($Hd=0,762 \pm 0,037$). Además en las muestras de guanacos, se encontraron dos haplotipos, uno de ellos también presente en Llamas.

Se obtuvo un valor de Tajima $D=2,00829$ el cual fue estadísticamente no significativo ($0.10 > P > 0.05$). Por lo tanto no se puede rechazar la neutralidad. También se probó el Test de McDonald-Kreitman con secuencias de guanacos como outgroup. El mismo no pudo completarse porque no se encontraron diferencias sinónimas y no-sinónimas fijadas entre las especies comparadas (Llamas y guanacos). Además, el cálculo de sustituciones no-sinónimas fue $dN=0,0015 \pm 0,0014$ y el de sustituciones sinónimas $dS=0$.

5.3.2 Determinación de las variantes alélicas y estudio del gen en los grupos de color.

En el mismo grupo de animales estudiado para MC1R (n=87), se secuenciaron los exones 2 y 3 de ASIP y se tipificó la delección del Exón 4 en geles de agarosa.

Se encontraron siete variantes alélicas con frecuencias muy dispares que se denominaron ASIP*1-7. El alelo ASIP*1 correspondió al alelo silvestre encontrado en guanacos. La definición de los mismos se observa en la Tabla 12.

Tabla 12. Definición de los alelos.

Nombre	Definición de los alelos (haplotipos)				
	c.1-153C>T	c.1-128A>C	c.225+56C>A	c.225+163C>A	Ex4 I/D [#]
ASIP*1 (107)	T	C	A	A	I
ASIP*2 (4)	T	C	A	A	D
ASIP*3 (54)	C	A	C	C	D
ASIP*4 (6)	T	A	C	C	D
ASIP*5 (1)	C	A	C	C	I
ASIP*6 (1)	T	C	C	C	D
ASIP*7 (1)	C	C	C	C	I

() frecuencia haplotípica.

I* =exón 4 sin deleccionar;

D[#]=delección del fragmento del exón 4.

ASIP*1 y ASIP*3 representaron el 61,5% y el 31,03% del total de los alelos de la muestra analizada. El alelo ASIP 3 se diferenció del más frecuente por la presencia de la delección en el Exón 4 y por otras cuatro sustituciones localizadas en regiones no codificantes. Los alelos ASIP*4 y ASIP*2 que también presentaron la delección tuvieron frecuencias muy bajas, mientras que el resto de las variantes apareció sólo una vez.

La distribución de frecuencias de los alelos en cada uno de los grupos de color de capas, se muestra en la Fig. 17.

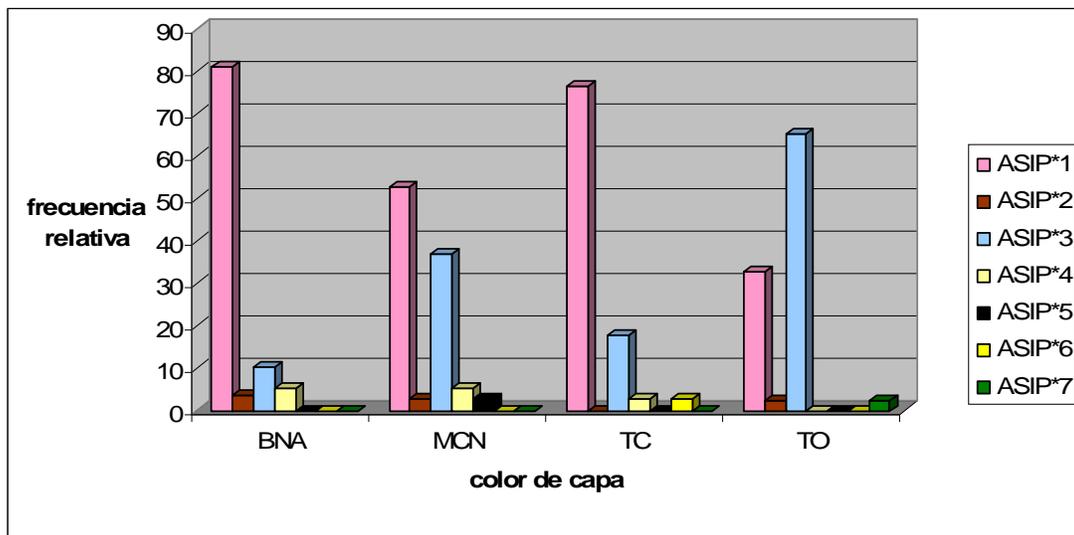


Fig. 17. Distribución de los alelos del gen ASIP por grupo de color de capa. La referencia de los alelos se encuentra a la derecha del gráfico. BNA=blanco no albino. MCN=cara negra. TC=tapado claro. TO=tapado oscuro

De la misma manera que en MC1R, en ASIP se observó que la distribución de las variantes alélicas fue significativamente diferente entre los distintos grupos (P-valor <0,0001). ASIP*1 fue el alelo más frecuente en los grupos BNA, MCN y TC mientras que en el grupo TO predominó el alelo deleciónado, ASIP*3.

Para simplificar el análisis y estudiar la relación de los genotipos observados con los fenotipos pigmentarios, se agruparon los alelos de acuerdo a la presencia o ausencia de la deleción.

Como se observa en la Fig. 18 la distribución de frecuencias genotípicas también fue diferente entre los grupo de color de capa (P-valor <0,0001).

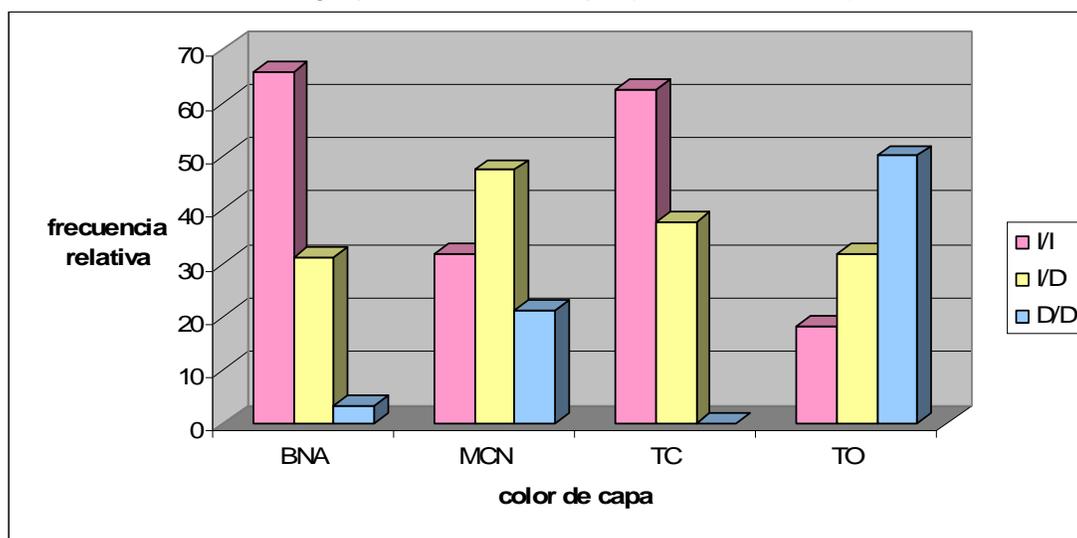


Fig. 18. Distribución de frecuencias genotípicas de ASIP La referencia de genotipos se encuentra a la derecha del gráfico. BNA=blanco no albino. MCN=cara negra. TC=tapado claro. TO=tapado oscuro

El 50% de Llamas con fenotipo eumelánico presentaron genotipos homocigotas para la delección (D/D). Esta combinación no se observó en ninguno de los animales del grupo TC y se encontró en muy baja frecuencia en el grupo BNA. En estos dos últimos predominaron los genotipos homocigotos y heterocigotos para el alelo sin delección. El grupo MCN presentó una distribución de genotipos intermedia entre los grupos TC y TO.

Las diferencias de distribución de los genotipos entre los distintos grupos, se analizaron mediante un test de Fisher. Los resultados se muestran en la Tabla 13.

Tabla 13. Resultados del Test de Fisher

	BNAvsMCN	BNAvsTC	BNAvsTO	MCNvsTC	MCNvsTO	TCvsTO
Genotipos (I/I-I/D-D/D)	P= 0,0339*	P= 0,7062	P=0,0001#	P=0,0678	P=0,1559	P=0,0015#
Delección en homocigosis	P= 0,3394	P=1,0000	P=0,0159*	P=0,2554	P=0,1489	P=0,0162*

* los valores de P en negrita fueron estadísticamente significativos

los valor de P fueron estadísticamente significativos después de aplicar la corrección de Bonferroni.

Las distribuciones de genotipos mostraron diferencias estadísticamente significativas cuando se comparó el grupo TO con BNA y TC, respectivamente. Estas diferencias continuaron siendo significativas aún después de aplicar la corrección de Bonferroni. No sucedió lo mismo en el resto de las comparaciones.

A partir de este momento, cuando en el texto se refiera a la variante ASIP*3 se incluye a todos los alelos que presentan la delección y como ASIP*1 a todos los alelos sin deleccionar.

Cuando se estudió en particular la delección en homocigosis, también se observaron diferencias entre el grupo TO con respecto al BNA y TC. Sin embargo, las mismas no fueron significativas cuando se corrigió por comparaciones múltiples. Esto puede deberse al hecho de que la corrección de Bonferroni resulta demasiado estricta o también a la presencia de un número considerable de animales heterocigotas u homocigotas para el alelo sin deleccionar dentro del

grupo TO. Estos resultados llevaron a examinar con más detalle los genotipos de estos animales mediante la secuenciación del fragmento completo correspondiente al Exón 4.

El resultado de este análisis mostró que exceptuando dos animales, todas las Llamas TO cuyos genotipos fueron heterocigotas u homocigotas ASIP*1/ASIP*1 presentaron la variante T en el SNP c.292C>T del Exón 4 (Fig 19). Teniendo en cuenta que con este polimorfismo se define un nuevo alelo denominado ASIP*8. De esa manera, los animales con fenotipo eumelánico, presentaron las siguientes combinaciones de alelos: ASIP*3/ASIP*3, ASIP*8/ASIP*8 o ASIP*3/ASIP*8. Es decir, fueron homocigotas para la delección, homocigotas para la variante T del polimorfismo c.292C>T o heterocigotas para la combinación de la delección y el polimorfismo.

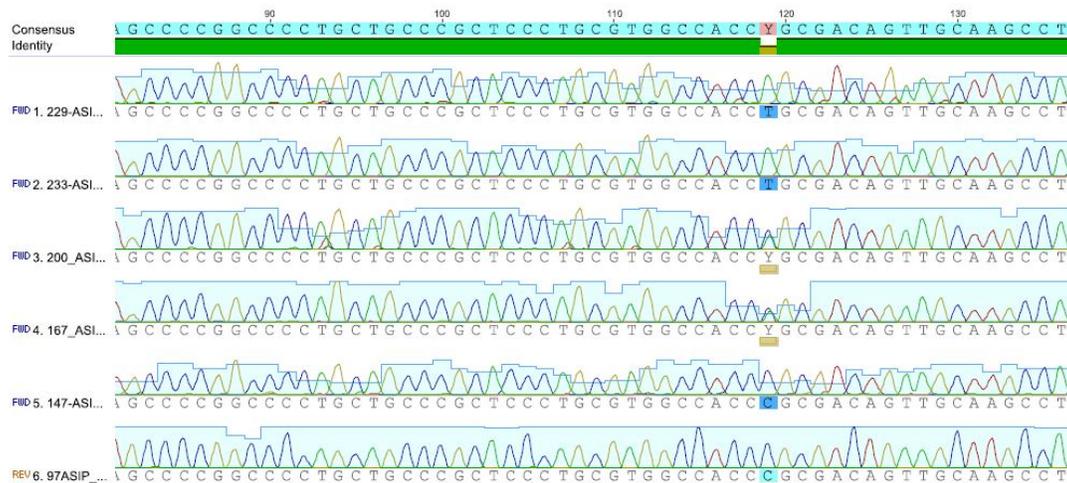


Fig. 19. Electroferograma proveniente de la secuenciación del Exón 4 del gen ASIP donde se observa el SNP c.292C>T indicado con la letra Y

En las figuras 20a, 20b, 20c y 20d se resumen las combinaciones genóticas de MC1R y ASIP encontradas en cada fenotipo.

Fig. 20a. TC



MC1R*1/-- /ASIP*1/--

Fig. 20b. TO



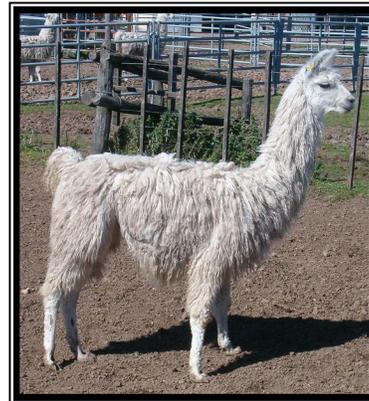
MC1R*1/-- /ASIP*3/ASIP*3
MC1R*1/-- /ASIP*3/ASIP*8
MC1R*1/-- /ASIP*8/ASIP*8

Fig. 20c. MCN



MC1R*1/MC1R*1 /--
MC1R*1/MC1R*3 /--
MC1R*3/MC1R*3/ASIP*1/ASIP*1
MC1R*3/MC1R*3/ASIP*3/ASIP*3

Fig.20d. BNA



MC1R*2/MC1R*2 / ASIP*1/--
MC1R*2/MC1R*3 / ASIP*1/--
MC1R*2/MC1R*3 / ASIP*3/ASIP*3 (1 solo)
MC1R*3/MC1R*3 / ASIP*1/--

Fig. 20. Genotipos de MC1R y ASIP observados para cada color de capa. a) TC=tapado claro b) TO=tapado oscuro c) MCN=cara negra y d) BNA=blanco no albino. -- : significa que puede llevar cualquier alelo del mismo gen.

En cada grupo de color se observaron combinaciones genóticas particulares. Todas las Llamas TC presentaron un genotipo con al menos una copia del alelo MC1R*1 combinado con ASIP*1 en homocigosis o heterocigosis.

Las Llamas TO se caracterizaron por la homocigosis o heterocigosis de los alelos ASIP*3 ó ASIP*8 combinado con MC1R*1. Algunos de los genotipos TO también fueron observados en el grupo MCN. Sin embargo el genotipo compuesto por la homocigosis de los alelos MC1R*3 y ASIP*3 fue exclusivo del grupo MCN.

Por su parte, el grupo BNA presentó combinaciones genotípicas propias que no fueron observadas en ningún grupo pigmentado. Algunas Llamas BNA presentaron la combinación MC1R*3/MC1R*3 / ASIP*1/-- que también apareció en el grupo MCN. Esto indica que habría otros genes interviniendo en el mecanismo.

5.4 Estudio de la segregación de los alelos de MC1R y ASIP y los fenotipos de color

La segregación de los alelos de cada gen con el color de capa se estudió en un grupo familiar.

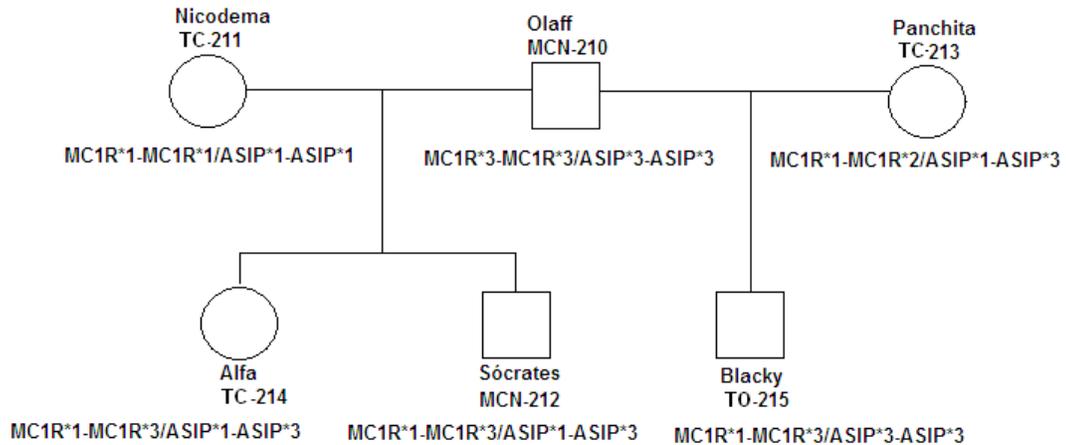


Fig. 21. Diagrama que muestra la segregación de los alelos de los genes MC1R y ASIP. TO=tapado oscuro; TC=tapado claro; MCN=cara negra. Los números indican el registro de ingreso al laboratorio.

En el diagrama (Fig. 21) se observa que Alfa heredó el alelo $ASIP^{*1}$ y también el fenotipo materno. Sócrates presentó el mismo genotipo de su hermana Alfa, pero expresó el fenotipo de su padre. En cambio Blacky no heredó el fenotipo de ninguno de sus progenitores y tal como se espera por su genotipo, expresó el fenotipo TO.

Por último, el padre Olaff y su cría Sócrates mostraron genotipos diferentes para el mismo color de capa.

5.5 Efecto de las sustituciones aminoacídicas en la estructura de las proteínas de MC1R y ASIP.

5.5.1 MC1R

De la traducción de la secuencia nucleotídica de MC1R se deduce una proteína de 317 aminoácidos. Se infirió que la proteína presenta la estructura típica de un receptor transmembrana tipo II con 7 dominios transmembrana, 3 loops extracelulares, 3 loops intracelulares, un extremo amino terminal extracelular y un extremo carboxilo terminal intracelular.

Como se observa en la Fig. 22, los diez cambios de aminoácidos están distribuidos en los dominios transmembrana II, III y IV, en los extremos amino y carboxilo terminal y en el primer loop intracelular.

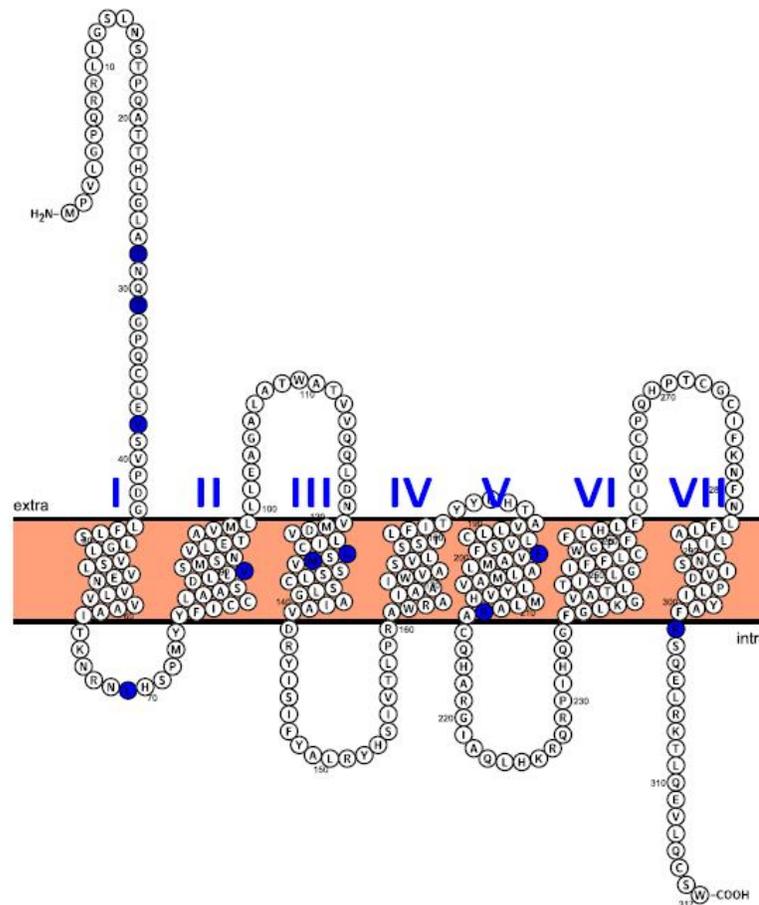


Fig. 22. Estructura 2D del gen MC1R en la Llama con las sustituciones de aminoácidos considerando la secuencia silvestre. I-VII=dominios transmembranas. H₂N=extremo amino terminal extracelular. -COOH= extremo carboxilo terminal intracelular. extra=extracelular. Intra=intracelular. Región sombreada en rosa=porción transmembrana. Los aminoácidos de color azul corresponden a las sustituciones no-sinónimas.

Se calcularon las probabilidades de que el cambio de aminoácido en los sitios p.V87M, p.G126S y p.M128T provoque un impacto funcional en la proteína (PANTHER 8.1).

De los 3 SNPs que presentaron sustituciones no sinónimas, el cambio p.G126S es el que tuvo el $P_{\text{deletéreo}}$ más bajo (Tabla 14), indicando que probablemente carezca de importancia a nivel funcional en la proteína. Si se considera que la sustitución p.G126S no provoca deterioro funcional, entonces las variantes alélicas MC1R*4 y MC1R*5 podrían convertirse en MC1R*3 y MC1R*1 respectivamente.

Los otros dos cambios de aminoácidos que conforman el alelo presentaron una probabilidad de daño moderada: con un $P_{\text{deletéreo}} = 0.66$ para p.V87M y un $P_{\text{deletéreo}} = 0.43$ para p.M128T.

Tabla 14. Tabla con valores de subPSEC y $P_{\text{deletéreos}}$ en el gen MC1R

Cambio de aminoácido	subPSEC	$P_{\text{deletéreo}}$
p.V87M	-3.6824	0.66427
p.G126S	-0.69872	0.09102
p.M128T	-2.7422	0.4359

$P_{\text{deletéreo}}$ =probabilidad de deterioro funcional

5.5.2 ASIP

El gen ASIP de la Llama codifica una proteína de 133 aminoácidos, la cual tiene un porcentaje de similitud con la proteína de alpaca, cerdo, vaca-oveja, conejo-caballo de 97.74%, 85.71%, 83.45% y 82%, respectivamente.

Mientras que la delección del Exón 4 (c.325_381del) provoca una ausencia de 19 aminoácidos en la proteína madura (desde el aminoácido 109 al 127), el SNP c.292C>T produce la sustitución p.R98C (Fig 23). El valor de $P_{\text{deletéreo}} = 0.827$ y subPSEC= -4.564 para p.R98C se considera alto y con probabilidades de provocar deterioro funcional.

```

ASIP*8/ASIP*8-TO : PRLLPAPCVATCDSDCKPPAPACCDPCAFCQCRFFRSVCSRVLSPTC
ASIP*8/ASIP*8-TO : PRLLPAPCVATCDSDCKPPAPACCDPCAFCQCRFFRSVCSRVLSPTC
ASIP*8/ASIP*8-TO : PRLLPAPCVATCDSDCKPPAPACCDPCAFCQCRFFRSVCSRVLSPTC
ASIP*3/ASIP*8-TO : PRLLPAPCVATCDSDCKPPAPAC-----VLSPTC
ASIP*3/ASIP*3-TO : PRLLPAPCVATRDSCKPPAPAC-----VLSPTC

```

Fig. 23. Alineamiento del extremo carboxilo terminal de la proteína de ASIP que muestra la delección de 19 aminoácidos en Llamas con fenotipo TO. El nombre de cada secuencia hace referencia al genotipo de las Llamas encontrado en este grupo de color. La delección está representada por líneas y la sustitución p.R98C sombreada en turquesa.

DISCUSSION

6.1 Caracterización y Diversidad genética de GH1, MC1R y ASIP

En este trabajo de tesis se caracterizaron por primera vez los genes GH1, MC1R y ASIP de la Llama y se describieron sus alelos. Es importante destacar que no se observaron variaciones en los guanacos analizados para el gen MC1R mientras que en ASIP se encontraron dos alelos. Por el contrario, las Llamas presentaron una gran variabilidad en estos genes.

Al igual que en otros mamíferos, el gen GH1 de la Llama comprende 5 exones y 4 intrones. La secuencia y longitud de los exones es muy conservada entre las especies de cetartiodáctilos. Como se esperaba, la secuencia de los intrones presentó un porcentaje de similitud más bajo.

También se caracterizó la región promotora del gen GH1 donde se localizaron 10 elementos regulatorios. De éste total, 4 (caja CAAT; TRE, d-Pit-1 y NRE) mostraron 100% de homología con todos los cetartiodáctilos comparados.

La mayoría de los promotores de los genes tienen una secuencia denominada caja TATA, que normalmente está situada 25pb por delante del punto de inicio. Esta caja constituye el único módulo del promotor que tiene una situación relativamente fija con respecto al punto de inicio. La secuencia consenso de 8pb está formada en su totalidad por pares A-T y sólo en una minoría de casos se encuentra algún par G-C. La caja TATA tiende a estar rodeada por secuencias ricas en G-C que podrían tener algún papel en el funcionamiento de la secuencia completa. Por otra parte, la importancia de la caja TATA es confirmada por el hecho de que la sustitución de una sola de sus bases podría dañar significativamente el promotor (Lewin B 1994). En la caja TATA de la Llama se observó una sustitución g.240T>C en la primera base. Sin embargo, este cambio, también observado en el dromedario, parece no afectar la expresión del gen ya que la proteína ha sido aislada de la glándula pituitaria de la alpaca y del camello (Biscoglio de Jiménez Bonino y col., 1981 y Martinat y col., 1990). Con respecto al elemento CRE, Maniou y colaboradores (2004) sugirieron que podría no ser funcional en cetartiodáctilos. Por este motivo, probablemente la secuencia CGTCA de CRE mostró bajos porcentajes de similitud entre la Llama y el resto de las especies comparadas.

Distintos autores han reportado un gran número de polimorfismos en el gen GH1 de humanos (Hasegawa y col., 2000; Horan y col., 2003; Millar y col., 2010),

bovinos (Thomas y col., 2007; Mullen y col., 2011), cerdos (Cheng y col., 2000; Li y col., 2006) y pollos (Nie y col., 2005) localizados en su mayoría en intrones y en el promotor y que están asociados con diferentes caracteres. En GH1 de la Llama se identificaron 15 polimorfismos de tipo SNP con una distribución no uniforme a lo largo del gen. Como se muestra en la Fig. 8 (pág. 53), existe una mayor concentración de SNPs hacia la región 5' del gen, principalmente en los intrones A y B. A diferencia de otras especies como la cabra donde se han descrito SNPs en los 5 exones de GH1 (Malveiro y col., 2001; Dettori y col., 2013), en Llamas sólo se localizó una sustitución sinónima en región codificante (Exón 5). La ausencia de sustituciones no-sinónimas ($dN=0$) en esta especie, indica que este tipo de cambios en la proteína serían rápidamente eliminados por selección purificadora.

En humano, Hasegawa y colaboradores (2000) describieron un polimorfismo en el intrón 4 ligado con dos SNPs de la región promotora, que están asociados con la secreción de la hormona y la estatura. En el promotor de GH1 de Llama se identificó un SNP g.237A>G que forma parte de la secuencia del elemento de unión a T3R. Este factor, tiene un rol importante en la regulación de la actividad del promotor de GH (Schaufele y col., 1992), por lo que el polimorfismo identificado podría tener significancia desde el punto de vista funcional.

La mayoría de las variaciones fenotípicas se producen por cambios en las regiones reguladoras de los genes. Sin embargo, el gen MC1R es una de las excepciones ya que las mutaciones conocidas en este locus, responsables de las variaciones en el color de capa, se producen en la región codificante (Hoekstra y col., 2006; Kijas y col., 1998; Fontanesi y col., 2006). En contraste con el patrón observado en GH1 donde todas las sustituciones fueron sinónimas, 10 de los polimorfismos identificados en MC1R resultaron no sinónimos. Además, en el gen ASIP se encontraron dos polimorfismos importantes en la región codificante, específicamente en el Exón 4. Uno de ellos provocó una sustitución no sinónima (c.292C>T) y el otro, una delección de 57pb (c.325_381del). Las diferencias también fueron notorias en la diversidad nucleotídica de la región codificante de los genes. Los valores de diversidad nucleotídica de MC1R ($\pi = 0,00204$) y de ASIP ($\pi = 0.00191$) fueron cerca de cuatro veces mayor que la de GH1 ($\pi=0,00057$).

La diversidad nucleotídica para el gen MC1R en las Llamas fue similar a la que se encontró en perros (Wang y col., 2013), ligeramente menor a la de los pollos de raza Hebei ($\pi= 0.0051$) (Guo y col., 2010) y considerablemente mas alta que la de los cerdos domésticos ($\pi= 0.00022$) (Li y col., 2010). Sin embargo la diversidad nucleotídica de ASIP ($\pi = 0.00191$) fue mas elevada que la de perros ($\pi = 0.00057$) (Wang y col., 2013).

Por su parte, los resultados del test de Tajima mostraron que ninguno de los tres genes se desvía del comportamiento esperado bajo neutralidad ($p>0.10$ en todos los casos). Sin embargo, se observó un elevado número de sustituciones no sinónimas, en particular para MC1R, lo que podría indicar que este gen está bajo selección. Para probar esta hipótesis se utilizó además el test de McDonald-Kreitman, pero el mismo no fue informativo debido a la ausencia de diferencias sinónimas y no-sinónimas fijadas entre las Llamas y los guanacos. Estos resultados sugieren que el hallazgo de un número de sustituciones no-sinónimas ($dN=0,0012$) 4 veces mayor que el de sustituciones sinónimas ($dS=0,0003$) en este gen, se debe probablemente a una relajación de presiones de selección.

El color de capa en los mamíferos es importante para el camuflaje y la comunicación social (Sponenberg 1997). Además es una característica productiva que ha sido seleccionada en muchas especies domésticas. En estos casos el efecto de la selección artificial conduce a una disminución en la variabilidad observada. El gen MC1R en Llamas, mostró una elevada diversidad genética. Por lo tanto, el alto número de sustituciones no-sinónimas encontradas en el gen MC1R podrían ser el resultado de una relajación de presiones de selección contra capas no camufladas, permitiendo que las sustituciones se mantengan.

6.2 Distribución de los alelos y posibles mecanismos que explican los distintos colores de capa en las Llamas

La diversidad de colores de capa que se observa en distintas especies animales brinda la oportunidad de aplicar los conocimientos genéticos sobre pigmentación para conocer el efecto e interacción de los genes que participan en su producción. En especies tales como ratones (Robbins y col., 1993), cerdos (Kijas y col., 1998), vacas (Klungland y col., 1995; Joerg y col., 1996) caballos (Marklund y col., 1996),

perros (Newton y col., 2000; Everts y col., 2000); conejos (Fontanesi y col., 2006) y alpacas (Feeley y Munyard 2009) se han descrito numerosas mutaciones en el gen MC1R que afectan el color de capa. Aquéllas con ganancia de función producen fenotipos eumelánicos que generalmente son de herencia dominante. Las mutaciones que provocan pérdida de función dan lugar a fenotipos feomelánicos que se heredan de manera recesiva. De esta manera, los animales portadores del alelo E pueden presentar la capa de color marrón oscuro o negro y si son portadores de dos alelos e, es decir ee, pueden presentar un color de capa rojizo. Según la especie, existen otros alelos que son causales de diferentes patrones de capa con una jerarquía de dominancia.

Sin embargo, de acuerdo con los resultados obtenidos en las Llamas, los alelos del gen MC1R sólo permitieron diferenciar grupos pigmentados (TC, TO y MCN) de los que carecían de pigmento (BNA). El alelo MC1R*1 estuvo presente en homocigosis o heterocigosis en los grupos de Llamas coloreadas pero no se lo observó en las Llamas blancas. En cambio en el grupo de animales BNA fue evidente la presencia del alelo MC1R*2 en homocigosis. Esta combinación no se volvió a repetir en ninguno de los otros colores de capa estudiados. Los alelos MC1R*1 y MC1R*2 se diferencian en los tres sitios que los definen (p.V87M, p.G126S y p.M128T). Cabe destacar que la sustitución p.M128T, aunque presentó un P_{del} moderado, es el que diferencia el alelo MC1R*2 de los alelos MC1R*1 y MC1R*3. Por lo tanto, este cambio sería el responsable de la presencia/ausencia de pigmento.

Se sabe que el genotipo e/e del gen MC1R está presente en los perros de las razas Pastor Alemán, Samoyedo, Akita, Schnauzer y Puli cuyo fenotipo es blanco con pigmento negro alrededor de los ojos y la nariz. Lo mismo podría ocurrir en las Llamas BNA con genotipo MC1R*2/MC1R*2, correspondiéndose con el genotipo e/e de esos perros. Pero, también se identificaron Llamas de fenotipo BNA con genotipos MC1R*2/MC1R*3 y MC1R*3/MC1R*3. Estas dos combinaciones también se observaron en animales coloreados lo que indica que otros mecanismos genéticos estarían interviniendo en la generación del fenotipo blanco.

La ausencia de pigmento podría deberse a la falta de melanocitos por causa del bloqueo del desarrollo o migración de los mismos. El gen KIT juega un rol central en la melanogénesis, en la migración y proliferación de melanoblastos. Se han

localizado mutaciones en este gen que originan fenotipos blancos o manchados en especies de caballos (Brooks y Bailey, 2005; Haase y col., 2007, 2010), cerdos (Giuffra y col., 1999; Pielberg y col., 2002) y gatos (Cooper y col., 2005).

Otro gen asociado con color de capa blanco es MITF (factor de transcripción asociado a microftalmia), un regulador clave en la pigmentación. Este gen juega un rol importante en la diferenciación de los melanocitos. Las mutaciones en el gen MITF causan una gran variedad de fenotipos diluidos, manchados y completamente blancos. Estos fenotipos producidos por el gen MITF han sido descritos en perros Boxer y Bull terrier (Karlsson y col., 2007) y en caballos (Hauswirth y col., 2012). Por lo tanto, mutaciones localizadas en los genes KIT o MITF podrían explicar el fenotipo BNA de las Llamas cuyo genotipo no sea MC1R*2/ MC1R*2.

Como se mencionó anteriormente, el alelo MC1R*1 permitió distinguir Llamas con capa pigmentada de aquellas que carecían de pigmento. Las Llamas que tuvieron al menos una copia del alelo MC1R*1 en sus genotipos presentaron color en la capa. Esto apoya la característica dominante de este alelo (E) involucrado en la síntesis de pigmentos. Sin embargo, no se encontró una variante alélicas del gen MC1R relacionada al fenotipo feomelánico. En base a los resultados observados las Llamas presentan un mecanismo genético diferente al de las alpacas. Las alpacas con la combinación A82/T126/C901 (EE ó Ee) son capaces de producir eumelanina y las que tuvieron la combinación G82/C126/T901 (ee), expresan sólo feomelanina (Feeley y Munyard, 2009). Estos tres sitios fueron identificados y publicados en todos los trabajos dedicados al estudio del gen MC1R en alpacas (Powell y col., 2008; Feeley y col., 2009; Guridi y col., 2011, Bathrachalam y col., 2011). En las Llamas, el SNP901 resultó monomórfico y los SNP82 y SNP126 (produce sustitución sinónima) aparecieron en muy baja frecuencia. La combinación 259/376/383 en las Llamas estuvo asociada con la presencia/ausencia de pigmento. De acuerdo con la historia evolutiva que presentan estas dos especies, se hubiera esperado que el mecanismo por el cual se generan los fenotipos de color sea el mismo.

En las Llamas, el genotipo MC1R*3/ MC1R*3 no sólo se encontró en BNA sino también en MCN. La presencia de este genotipo en BNA ya fue explicado anteriormente. El patrón MCN se caracteriza por capa rojiza y cara y extremidades negras, es decir que se expresan ambos tipos de pigmentos. En las

vacas y en los cerdos el alelo E^+ permite la expresión completa tanto de feomelanina como de eumelanina (Klungland y col., 1995 y Kijas y col., 1998). Esto sugiere que el alelo silvestre MC1R*3 se corresponda con el alelo E^+ .

Sin embargo ¿cómo se explica el fenotipo feomelánico en las Llamas si el alelo MC1R*1 formó parte de sus genotipos? Este fenotipo podría explicarse de la misma manera que se producen los fenotipos feomelánicos en algunas razas de perros.

El gen ASIP juega un papel crucial en incrementar la producción de feomelanina y disminuir la de eumelanina mediante el bloqueo de la vía de señalización del MC1R (Lu y col., 1994). Los alelos dominantes de ASIP están asociados con la proteína constitutivamente activa, lo que resulta en colores de capas feomelánicas, mientras que la homocigosis de los alelos inactivos causa colores de capas eumelánicas.

En los perros, se han descrito dos mecanismos por medio de los cuales esta especie puede tener su pelaje de color rojizo (Schmutz 2005). El primero es causado por el genotipo e/e en el gen MC1R. Estos perros no pueden producir pigmento eumelánico en su pelo (Fig. 24a).

El segundo, es causado por el alelo dominante a^y del gen ASIP. Debido a que a^y es dominante en la serie alélica, una copia es suficiente para causar este tipo de color que en muchas razas se denomina “beige”. Estos perros suelen tener bigotes negros o algunos pelos oscuros entremezclados en su capa (Fig. 24b).



Fig. 24 a



Fig. 24 b

Fig. 24. a) ejemplo de un perro feomelánico “ e/e ” b) ejemplo de un perro feomelánico “ $a^y/-$ ” y “ E/E ” en el gen MC1R. (Raza Shar-Pei). Fotos: <http://homepage.usask.ca/~schmutz/Shar-Pei.html>

Este segundo mecanismo podría ser el que ocurre en las Llamas. En el grupo TC, caracterizado por fenotipos feomelánicos, todas las Llamas fueron portadoras del alelo ASIP*1. Como se observa en las Fig. 25 a y b, las Llamas con este fenotipo tienen expresión de eumelanina residual en regiones puntuales (alrededor de los ojos o en la cara) de la misma manera que se observó en los perros (Schmutz 2005).



Fig. 25a



Fig. 25b

Fig.25 a y b: Distribución de pigmento eumelánico en Llamas feomelánicas

Si ASIP*1 fuera el alelo dominante, bastaría una sola copia para que se exprese el fenotipo. La mayoría de las Llamas BNA presentaron una copia del alelo ASIP*1 en su genotipo. Por lo que tampoco puede descartarse la dilución extrema del fenotipo feomelánico como mecanismo de producción de este patrón. Esto concuerda con el modo de herencia dominante del fenotipo BNA propuesto por Frank y colaboradores (2001, 2006a). Es decir, que se han propuesto más de un mecanismo que generan el patrón BNA. Los genes KIT, MITF y la dilución actuarían de manera dominante y el alelo MC1R*2 en homocigosis lo haría por medio de la recesividad.

En el grupo TO la mitad de las Llamas mostraron genotipo homocigota ASIP*3/ASIP*3. Estos resultados coinciden con que el modo de herencia del fenotipo eumelánico es recesivo a todos los otros patrones de pigmentación (Frank y col., 2001; 2006a). El resto de las Llamas fueron homocigotas ASIP*8/ASIP*8 o heterocigotas ASIP*3/ASIP*8. Por lo tanto los animales con fenotipos eumelánicos fueron homocigotas para la delección, homocigotas para la

variante T del polimorfismo c.292C>T o heterocigotas para la combinación de la deleción y el polimorfismo.

En especies tales como caballo, perro y alpaca se ha encontrado que un alelo en homocigosis del gen ASIP provoca la producción de pigmento eumelánico en toda la capa. En los caballos, se produce por una deleción de 11 nucleótidos en el exón 2 y solamente cuando el alelo que lleva la deleción está en homocigosis, se distribuye pigmento negro por toda la capa (Rieder y col., 2001). En las razas de Pastor alemán, Samoyedo y Puli, el color de capa negro recesivo es causado por el alelo a (provocado por la sustitución de una Arginina por una Cisteína en el sitio 96) en el exón 4 del gen ASIP (Kerns y col., 2004). En alpacas también se describieron polimorfismos en el Exón 4, p.R98C, p.C109_R127del y p.R118H, asociados al color negro (Feeley y col., 2011). El alineamiento de las secuencias de Llama con la de alpaca y perro confirmó que el SNP p.R98C es equivalente a p.R96C. Esto sugiere que la sustitución encontrada en Llamas tendría un efecto similar al observado en perros (Kerns y col., 2004). El Exón 4 codifica los últimos cuarenta aminoácidos de ASIP los cuales constituyen el dominio C-terminal de la proteína. La mayoría de estos residuos son responsables de la actividad de la proteína y de su unión al receptor (Miltenberger y col., 2002). Recientes investigaciones informaron que los diez residuos de cisteína dentro del dominio C-terminal están involucrados en las uniones de cinco puentes disulfuro que actúan para estabilizar a la proteína y forman un motivo estructural proteico (ICK- inhibitor cystine knot) que contiene tres puentes disulfuros (Yu y Millhauser 2007). Esta estructura plegada (ICK) permite la exposición de tres residuos conservados Arginina-Fenilalanina-Fenilalanina (RFF), esenciales para el funcionamiento de ASIP facilitando la interacción entre este ligando y su receptor (Miltenberg y col., 2002). La probabilidad de daño que significa la incorporación de una nueva cisteína al dominio C-terminal en la secuencia de aminoácidos de la proteína de Llama fue de $P_{\text{deletéreo p.R98C}} = 0.82696$. Este alto valor estaría indicando que la sustitución de una arginina por una cisteína provoca una alteración en la proteína que probablemente afecte su función. Por otro lado, la deleción p.C109_R127del provoca la pérdida de 19 aminoácidos entre los que se encuentran las cisteínas que forman los 5 puentes disulfuro y el sitio ICK. Con este tipo de alteraciones y del motivo estructural proteico, que interacciona con el receptor, la proteína podría perder totalmente su función. De esta manera, las Llamas que presenten la

combinación de un alelo con la delección y el otro con la sustitución p.R98C ó la homocigosis de cualquiera de ellos, puede dar una proteína inactiva. Es decir, que si ASIP presenta un estado inactivo, no puede actuar como antagonista bloqueando la interacción MC1R- α MSH, lo que provocaría la síntesis de pigmento eumelánico en lugar de feomelánico.

El grupo de Llamas con fenotipo MCN (Fig 26a) fue el más heterogéneo, con genotipos cuyas frecuencias fueron intermedias entre el grupo TC y TO. En el grupo MCN no se encontró asociación entre los alelos definidos para el gen ASIP y el color de capa. En otras especies, patrones similares a éste están controlados por el gen ASIP. En los caballos el alelo dominante A del gen ASIP restringe la distribución de pigmento negro a distintos puntos del cuerpo del animal (bordes de las orejas, patas, crines, cola) (Fig. 26b). En algunas razas de perros el alelo a^1 es el responsable del patrón negro y tostado (black and tan - Dreger y Schmutz 2011) (Fig. 26c).



Fig. 26a



Fig. 26b



Fig. 26c

Fig. 26. a) Llama MCN b) Caballo colorado o castaño Foto: http://www.argentina-caballos.com.ar/fotos/1584_IMG_9026.JPG. c) Perro negro y tostado (black and tan) de raza Gordon Setter Foto: <http://homepage.usask.ca/~schmutz/agouti.html#tricolor>

En ratón, cerdo, conejo y perro los patrones de pigmentación dorso-ventral o aquellos que presentan la mayor parte del cuerpo oscuro y algunas regiones claras están controlados por el uso alternativo de diferentes promotores y primeros exones no traducidos de ASIP (Vrieling y col., 1994; Drögemüller y col., 2006; Fontanesi y col., 2010; Ciampolini R. y col., 2012). Recientemente, Bathrachalam y colaboradores (2013) caracterizaron el gen *ASIP* en alpacas y estudiaron el ARNm aislado de la piel de alpacas blancas, marrones y negras,

revelando la presencia de diferentes transcritos con expresión dependiente del color. En las Llamas no se encontraron variaciones en las regiones estudiadas de ASIP asociadas a este fenotipo.

En el estudio de segregación no se observó una segregación completa de los alelos de ambos genes con los fenotipos. Esto fue claro sobre todo para el fenotipo MCN. Sócrates, la cría de Olaff, heredó el fenotipo del padre pero aun resulta difícil explicar el patrón con las combinaciones genotípicas obtenidas. Esto también puede observarse entre los hermanos Alfa y Sócrates que presentaron fenotipos diferentes e igual genotipo. Especialmente, Olaff presentó una combinación particular de alelos de MC1R y ASIP que sólo fue encontrado en Llamas MCN. Es posible que el color de capa MCN este determinado por diferencias en la expresión del gen ASIP en las distintas zonas del cuerpo y que interacciones epistáticas entre los genes MC1R y ASIP jueguen tambien un rol en la manifestación del fenotipo.

CONCLUSIONES

Del análisis de los resultados obtenidos se deducen las siguientes conclusiones:

- Por primera vez se caracterizaron y describieron los genes GH1, MC1R y ASIP de la Llama, especie donde la información genómica aún es muy escasa.
- Los tres genes resultaron muy variables. La distribución de polimorfismos fue totalmente diferente en cada uno de los genes, reflejando distintas presiones de selección.
- Se indentificó un polimorfismo en el promotor de GH que podría ser funcionalmente importante. Por lo tanto se lo considera útil para su aplicación en futuros estudios de asociación.
- Se describieron las variantes alélicas de los genes MC1R y ASIP relacionados al color de capa. Los alelos mas frecuentes en el gen MC1R fueron MC1R*1, MC1R*2 y MC1R*3, y en ASIP fueron ASIP*1 y ASIP*3.
- No se encontró ningún alelo del gen MC1R asociado a fenotipos feomelánicos. Sin embargo, se identificaron dos alelos que permitieron diferenciar grupos de Llamas pigmentadas (TC, TO y MCN) de las que carecían de pigmento (BNA).
- En el gen ASIP se identificaron dos polimorfismos en el Exón 4, p.R98C y p.C109_R127del, que permitieron diferenciar fenotipos feomelánicos de los eumelánicos. Estos resultados corroboran a nivel molecular que los fenotipos pigmentarios en las Llamas son segregados principalmente por el locus *Agouti*.
- El fenotipo MCN fue el más heterogéneo en cuanto a los genotipos observados. No se encontró un alelo asociado a este patrón. Quizás otras mutaciones en regiones diferentes a las estudiadas podrían explicar este patrón o bien, podría deberse a diferencias en la expresión del gen ASIP en distintas zonas del cuerpo, como sucede con otras especies.

- La genética del color en Camélidos es compleja. Además de ASIP y MC1R, otros genes regulan la pigmentación producida. Por eso es necesario continuar la investigación con otros genes que podrían estar interviniendo en la determinación de los distintos fenotipos de las Llamas.

La importancia de la caracterización de los genes candidatos abordados en esta tesis radica en el aporte original al conocimiento, en primer lugar sobre la secuencia, estructura y variación de GH1. En segundo lugar, sobre la genética del color de capa a nivel molecular describiendo los alelos de los genes MC1R y ASIP y su asociación con los fenotipos seleccionados para el estudio. Hasta el momento las secuencias de estos genes eran desconocidas en la Llama. Por lo tanto, los resultados obtenidos brindan información necesaria para realizar posteriormente estudios de asociación de GH1 con caracteres de interés productivo. Además, beneficiaría a los criadores de Llamas con el conocimiento del genotipo para la obtención de fenotipos de color deseados.

BIBLIOGRAFIA

- Abdel-Meguid SS, Shieh HS, Smith WW, Dayringer HE, Violand BN, Bentle LA. (1987). Three-dimensional structure of a genetically engineered variant of porcine growth hormone. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 84, 6434-6437.
- Adot O (2010). Introducción a la industrialización de la lana y las fibras especiales. Consultado en abril de 2014 en www.uccor.edu.ar/paginas/agronomia/SUPPRAD.php
- Ardiyanti A, Oki Y, Suda Y, Suzuki K, Chikuni K, Obara Y, Katoh K. (2009). Effects of GH gene polymorphism and sex on carcass traits and fatty acid compositions in Japanese Black cattle. *Anim Sci J.* 80(1):62-9.
- Bandelt HJ, Forster P, Röhl A. (1999). Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Mol. Biol. Evol.* 16, 37–48.
- Bathrachalam C, Manna VL, Renieri C, Terza AL. (2011). Asip and MC1R cDNA polymorphism in alpaca. *Fibre production in South American camelids and other fibre animals.* pp. 93–96.
- Bathrachalam C, Renieri C, La Manna V, La Terza A. (2013). The alpaca agouti gene: genomic locus, transcripts and causative mutations of eumelanic and pheomelanic coat color. *Gene* 521(2):303-10
- Benson, G. (1999). Tandem repeats finder: a program to analyze DNA sequences. *Nucleic Acids Res.* 27, 573-580.
- Biscoglio de Jiménez Bonino MJ, Cascone O, Arnao de Nué AI, Santomé JA, Sanchez D, Oré R, Villavicencio M, (1981). Isolation and characterization of alpaca growth hormone. *Int. J. Peptide Protein Res.* 17, 374–379.
- Biscoglio de Jiménez Bonino M, Arnao de Nué I, Oré R, Sanchez D, Ferrara P, Capdevielle J, Cascone O, (1991). Primary structure of alpaca growth hormone. *Int. J. Peptide Protein Res.* 38, 193–197.
- Breathnach R, Chambon, P. (1981). Organization and expression of eukaryotic split genes coding for proteins. *Annu. Rev. Biochem.* 50, 349-383.
- Brooks SA y Bailey E (2005) Exon skipping in the KIT gene causes a sabino spotting pattern in horses. *Mamm. Genome* 16 893–902
- Brunham LR, Singaraja RR, Pape TD, Kejariwal A, Thomas PD, Hayden MR. (2005). Accurate prediction of the functional significance of single nucleotide polymorphisms and mutations in the ABCA1 gene. *PLoS Genet* 1:e83.
- Bultman SJ, Michaud EJ, Woychik RP. (1992). Molecular characterization of the mouse agouti locus. *Cell*, 71:1195-1204

- Candille SI, Kaelin CB, Cattanach BM, Yu B, Thompson DA, Nix MA, Kerns JA, Schmut SM, Millhauser G. & Barsh GS. (2007). A β -defensin mutation causes black coat colour in domestic dogs. *Science* 318,1418–1423.
- Cascone O, Biscoglio de Jiménez Bonino M, Peña C, Santomé JA, Arnao de Nué AI, Sánchez D, Oré R, Villavicencio M. (1984). Amino acid sequences around the cystine residues in alpaca growth hormone. *Acta Physiol Pharmacol Latinoam.*34(2):123-30.
- Castillo Cobián Amanda (2007).La selección natural a nivel molecular. En Luis E. Eguiarte, Valeria Souza y Xitlali Aguirre (Comps). *Ecología Molecular.* (pp.11-48), DF, México. Ed. Progreso.
- Cecchi T, Cozzali C, Passamonti P, Ceccarelli P, Pucciarelli F, Gargiulo AM, Frank EN, Renieri C. (2004) Melanins and melanosomes from Llama (*Lama glama*).*Pig. Cell. Res.* 17: 307-311.
- Cecchi T, Valbonesi A, Passamonti P, Frank E , Renieri C. (2007) Quantitative variation of melanins in Llama (*Lama glama*) *Small Rumin Res.* 71 (1-30) 52-58
- Cheng WT, Lee CH, Hung CM, Chang TJ, Chen CM. (2000). Growth hormone gene polymorphisms and growth performance traits in Duroc, Landrace and Tao-Yuan pigs. *Theriogenology.* 54(8):1225-37.
- Ciampolini R, Cecchi F, Spaterna A, Bramante A, Bardet SM, Oulmouden A. (2012). Characterization of different 5'-untranslated exons of the ASIP gene in black-and-tan Doberman Pinscher and brindle Boxer dogs. *Anim Genet,* 44(1):114-7.
- Cieslak M, Reissmann M, Hofreiter M y Ludwig, A. (2011). Colours of domestication. *Biol Rev,* 86: 885–899
- Coates W y Ayerza, R. (2004). Fatty acid composition of llama muscle and internal fat in two Argentinian herds. *Small Rumin Res,* 52, 231–238.
- Cooper MP, Fretwell N, Bailey SJ, Lyons LA. (2005). White spotting in the domestic cat (*Felis catus*) maps near KIT on feline chromosome B1. *Anim Genet* 37 163–165.
- Cransberg R y Munyard KA. (2011). Polymorphisms detected in the tyrosinase and matp (slc45a2) genes did not explain coat colour dilution in a sample of Alpaca (*Vicugna pacos*). *Small Rumin. Res.* 95, 92–96.

- Cransberg R, Wakamatsu K, Munyard K. (2013). Melanin characterisation suggests that the “brown” phenotype in alpaca (*Vicugna pacos*) is predominantly pheomelanin. *Small Rumin Res* 114, 240–246
- Cristofanelli S, Antonini M, Torres D, Polidori P y Renieri C. (2004). Meat and carcass quality from Peruvian llama (*Lama glama*) and alpaca (*Lama pacos*). *Meat Sci*, 66, 589–593.
- de Lamo DA (2011). Camélidos sudamericanos. *Historia, usos y sanidad animal*. Buenos Aires, SENASA.
- Dettori ML, Rocchigiani AM, Luridiana S, Mura MC, Carcangiu V, Pazzola M, Vacca GM. (2013). Growth hormone gene variability and its effects on milk traits in primiparous Sarda goats. *J Dairy Res*. 80(3):255-62.
- Dreger DL, Schmutz SM (2011). A SINE insertion causes the black-and-tan and saddle tan phenotypes in domestic dogs. *J Hered*. 102 Suppl 1:S11-8
- Drögemüller C, Giese A, Martins-Wess F, Wiedemann S, Andersson L, Brenig B, Fries R, Leeb T. (2006). The mutation causing the black-and-tan pigmentation phenotype of Mangalitza pigs maps to the porcine ASIP locus but does not affect its coding sequence. *Mamm Genome* 17, 58–66
- Drummond AJ, Ashton B, Cheung M, Heled J, Kearse M, Moir R, Stones-Havas, S, Thierer T, Wilson A. (2009) Geneious v4.7. Available from <http://www.geneious.com/>
- Eizirik E, Yuhki N, Johnson WE, Menotti-Raymond M, Hannah SS y O’Brien SJ. (2003). Molecular genetics and evolution of melanism in the cat family. *Curr Biol* 13, 448–453
- Etherton TD y Bauman DE. (1998). Biology of Somatotropin in growth and lactation of domestic animals. *Physiol Rev*, 78(3):745-761
- Everts RE, Rothuizen J, van Oost BA. (2000). Identification of a premature stop codon in the melanocyte-stimulating hormone receptor gene (MC1R) in Labrador and Golden retrievers with yellow coat colour. *Anim Genet*. 31(3):194-9.
- Excoffier L, Lischer HL. (2010). Arlequin suite ver 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Mol. Ecol. Resour*. 10, 564–567.
- Fan R, Gang Y, Changsheng D. (2010). Study of hair melanins in various hair color alpaca (*Lama Pacos*). *Asian-Aust. J. Anim. Sci*. 23, 444–449.

- FAO, 2005. Situación actual de los camélidos sudamericanos en argentina. Proyecto de Cooperación Técnica en apoyo a la crianza y aprovechamiento de los Camélidos Sudamericanos en la Región Andina *TCP/RLA/2914*: 1 - 38.
- Feeley NL y Munyard KA. (2009). Characterisation of the Melanocortin 1 Receptor gene in Alpaca and identification of possible markers associated with phenotypic variations. *Anim Prod Sci* 49 (8): 675-681.
- Feeley NL, Bottomley S y Munyard KA. (2011). Three novel mutations in ASIP associated with black fibre in alpacas (*Vicugna pacos*). *J Agr Sci* 149 (4): 529-538.
- Fontanesi L, Tazzoli M, Beretti F, Russo V. (2006) Mutations in the melanocortin 1 receptor (MC1R) gene are associated with coat colours in the domestic rabbit (*Oryctolagus cuniculus*). *Anim Genet*, 37: 489–493
- Fontanesi L, Forestier L, Allain D, Scotti E, Beretti F, Deretz-Picoulet S, Pecchioli E, Vernesi C, Robinson TJ, Malaney JL, Russo V, Oulmouden A. (2010). Characterization of the rabbit agouti signaling protein (ASIP) gene: transcripts and phylogenetic analyses and identification of the causative mutation of the nonagouti black coat colour. *Genomics* 95, 166–75.
- Forsyth IA, Wallis M. (2002). Growth hormone and prolactin--molecular and functional evolution. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*. (3):291-312.
- Frank, EN. (1997). Mejoramiento genético en Camélidos sudamericanos. Una propuesta para la población Argentina. *Actas 2° Seminario Internacional de Camélidos Sudamericanos Domésticos*. http://www.produccion-animal.com.ar/libros_on_line/23-curso_camelidos_1999/04-mejoramiento_genetico.pdf
- Frank EN, Renieri C, Hick MVH, Lauvergne JJ. (1998a) Descripción fenotípica del color del vellón en Camélidos Sudamericanos Domésticos. I. Patrones pigmentarios. En: *22° Cong. Arg. de Prod. Anim.* Río Cuarto, Córdoba. Vol.18. Sup. 1 (p. 259).
- Frank EN, Renieri C, Hick MVH, Lauvergne, JJ. (1998b) Descripción fenotípica del color del vellón en Camélidos Sudamericanos Domésticos. II. Alteraciones de los patrones pigmentarios. En: *22° Cong. Arg. de Prod. Anim.* Río Cuarto, Córdoba. Vol.18. Sup. 1 (p.260)

- Frank, EN. (2001). Descripción y análisis de segregación de fenotipos de color y tipos de vellón en Llamas argentinas. Tesis Doctoral UBA, 204pp.
- Frank EN, Hick MVH, Gauna CD, Lamas HE, Renieri C, Antonini M. (2006a). Phenotypic and genetic description of fibre traits in South American domestic camelids (Llamas and alpacas). *Small Rumin Res*, 61:113-129
- Frank EN, Hick MVH, Lamas HE, Gauna CD, Molina MG. (2006b). Effects of age-class, shearing interval, fleece and color Types on fibre quality and production in Argentine Llamas. *Small Rumin. Res.* 61, 131–142.
- Frank EN, Hick MVH, Molina MG y Caruso LM. (2009). Heredabilidades, correlaciones fenotípicas, correlaciones genéticas y repetibilidades de variables productivas en Llamas argentinas. *Archivos Latinoamericanos de Producción Animal*, 17(3-4)103-107
- Gemmell, NJ and Akiyama S. (1996). An efficient method for the extraction of DNA from vertebrate tissues. *Trends Genet.* 12(9):338-9.
- Giuffra E, Evans G, Tornsten A, Wales R, Day A, Looft H, Plastow G, Andersson, L. (1999). The belt mutation in pigs is an allele at the dominant white (*I/KIT*) locus. *Mamm Genome* 10, 1132–1136.
- Guo XL, Li XL, Li Y, Gu ZL, Zheng CS, Wei ZH, Wang JS, Zhou RY, Li LH, Zheng HQ. (2010). Genetic variation of chicken MC1R gene in different plumage colour populations. *Br Poult Sci.* 51(6):734-9
- Guridi M, Soret B, Alfonso L, Arana A. (2011). Single nucleotide polymorphisms in the Melanocortin 1 Receptor gene are linked with lightness of fibre colour in Peruvian Alpaca (*Vicugna pacos*). *Anim Genet.* 42(6):679-82.
- Haase B, Brooks SA, Schlumbaum A, Azor PJ, Bailey E, Alaeddine F, Mevissen M, Burger D, Poncet PA, Rieder S, Leeb T. (2007). Allelic heterogeneity at the equine KIT Locus in dominant white (W) horses. *PLoS Genet* 3 (11), e195.
- Haase B, Obexer-Ruff G, Dolf G, Rieder S, Burger D, Poncet PA, Gerber V, Howard J, Leeb T. (2010). Hematological parameters are normal in dominant white Franches-Montagnes horses carrying a KIT mutation. *Vet J.*184:315–7.
- Hasegawa Y, Fujii K, Yamada M, Igarashi Y, Tachibana K, Tanaka T, Onigata K, Nishi Y, Kato S, Hasegawa T. (2000). Identification of novel human GH-1 gene polymorphisms that are associated with growth hormone secretion and height. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 85, 1290-1295.

- Hassanin A, Delsuc F, Ropiquet A, Hammer C, Jansen van Vuuren B, Matthee C, Ruiz-Garcia M, Catzeflis F, Areskoug V, Nguyen TT, Couloux A. (2012). Pattern and timing of diversification of *Cetartiodactyla* (*Mammalia*, *Laurasiatheria*), as revealed by a comprehensive analysis of mitochondrial genomes. *C R Biol.* 335(1):32-50.
- Hauswirth R, Haase B, Blatter M, Brooks SA, Burger D, Drögemüller C, Gerber V, Henke D, Janda J, Jude R, Magdesian KG, Matthews JM, Poncet PA Svansson V, Tozaki T, Wilkinson-White L, Penedo MC, Rieder S, Leeb T. (2012). Mutations in MITF and PAX3 cause "splashed white" and other white spotting phenotypes in horses. *PLoS Genet.* 8(4)
- Hick MVH, Lamas HE, Echenique J, Prieto A, Castillo MF, Frank EN. (2009). Estudio demográfico de los atributos morfológicos y productivos en poblaciones de Llamas (*Lama glama*) de la provincia de Jujuy, Argentina. *Anim Genet Res Information*, 45, 71–78
- 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.
- Horan M, Millar DS, Hedderich J, Lewis G, Newsway V, Mo N, Fryklund L, Procter AM, Krawczak M, Cooper DN. (2003). Human growth hormone 1 (GH1) gene expression: complex haplotype-dependent influence of polymorphic variation in the proximal promoter and locus control region. *Hum Mutat.* 21(4):408-23.
- Hoekstra HE, Hirschmann RJ, Bunday RA, Insel PA, Crossland JP. (2006). A single amino acid mutation contributes to adaptive beach mouse color pattern. *Science.* 313(5783):101-4.
- Imes DL, Geary L A, Grahn RA. y Lyons LA. (2006). Albinism in the domestic cat (*Felis catus*) is associated with a *tyrosinase* (*TYR*) mutation. *Anim Genet* 37, 175–178.
- Ishida T, Umebayashi A, Tsuruta S, Akashi R, Harada H. (2010). Polymorphisms in growth hormone gene and their associations with calf weight in Japanese Black cattle. *Anim Sci J.* 81(6):623-9.
- Jackling FC, Johnson WE, Appleton BR. (2012). The Genetic Inheritance of the Blue-eyed White Phenotype in Alpacas (*Vicugna pacos*). *J Hered.* 1-11

- Joerg H, Fries HR, Meijernik E, Stranzinger GF. (1996). Red coat colour in Holstein cattle is associated with a deletion in the MSHR gene. *Mamm Genome*. 7,17–318.
- Kadwell M, Fernández M, Stanley H, Baldi R, Wheeler JC, Rosadio R y Bruford MW. (2001). Genetic analysis reveals the wild ancestors of the llama and alpaca. *P R Soc London B* 268: 2575 2584
- Karlsson E , Baranowska I, Wade CM, Salmon Hillbertz NH, Zody MC, Anderson N, Biagi TM, Patterson N, Pielberg GR, Kulbokas EJ 3rd, Comstock KE, Keller ET, Mesirov JP, von Euler H, Kämpe O, Hedhammar A, Lander ES, Andersson G, Andersson L, Lindblad-Toh K. (2007) Efficient mapping of Mendelian traits in dogs through genome-wide association. *Nat Genet* 39, 1321–1328.
- Katoh K, Kouno S, Okazaki A, Suzuki K, Obara Y. (2008). Interaction of GH polymorphism with body weight and endocrine functions in Japanese black calves. *Domest Anim Endocrinol*. 34(1):25-30
- Kerns JA, Newton J, Berryere TG, Rubin EM, Cheng JF, Schmutz SM, Barsh GS. (2004). Characterization of the dog Agouti gene and a nonagouti mutation in German Shepherd Dogs. *Mamm Genome*. 15(10):798-808.
- Kerns,JA, Cargill,EJ, Clark LA, Candill SI, Berryere TG, Olivier M, Lust G, Todhunter RJ, Schmutz SM, Murphy KE, Barsh GS. (2007). Linkage and segregation analysis of black and brindle coat color in domestic dogs. *Genetics* 176, 1979–89.
- Kijas, JM, Wales R, Tornsten A, Chardon P, Moller M, Anedersson L (1998). Melanocortin Receptor 1 (MC1R) mutations and coat color in pigs. *Genetics* 150 1177–1185
- Kimura, M. (1968). Evolutionary rate at the molecular level. *Nature* 217(129):624-626.
- Klungland H, Vage DI, Gomez-Raya L, Adalsteinsson S, Lien S. (1995). The role of melanocyte-stimulating hormone (MSH) receptor in bovine coat color determination. *Mamm Genome* 6, 636–639.
- Lanari MR. (2008). Producción de fibras caprinas -Mohair y Cashmere- en Argentina. *Revista Argentina de Producción Animal* 28 (3): 255-259
- Lee M, Schaeffer NK. Anterior pituitary growth hormone and the composition of growth. *J Nutr* 1934;7:337 – 63.

- Lewin B. (1994). Genes IV. Editorial Reverté, S.A., 2ª Edición. Barcelona. pp744
- Leyva VV y Falcón N. (2007). Evaluación de las medidas corporales para la selección de llamas madres y crías. *Rev Inv Vet*, 18 (1): 18-29
- Li J, Ran XQ, Wang JF. (2006). Identification and function of the growth hormone gene in Rongjiang pig of China. *Acta Physiologica Sinica*. 58(3):217-24.
- Li J, Yang H, Li JR, Li HP, Ning T, Pan XR, Shi P, Zhang YP. (2010). Artificial selection of the melanocortin receptor 1 gene in Chinese domestic pigs during domestication. *Heredity* (Edinb). 105(3):274-81.
- Librado P y Rozas J. (2009). DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics* 25,1451–1452.
- Lu D, D Willard, IR Patel, S Kadwell, L Overton, Kost T, Luther M, Chen W, Woychik RP, Wilkison WO, y col. (1994). Agouti protein is an antagonist of the melanocyte-stimulating hormone receptor. *Nature*, 371:799- 802
- Maj A, Korczak M. Bagnicka E, Zwierzchowski L, Pierzchała M. (2007). S TG-repeat polymorphism in the 5´noncoding region of the growth hormone receptor gene for its association with milk production traits. *Small Rumin Res*, 67 (2-3):279-284
- Malveiro E, Pereira M, Marques PX, Santos IC, Belo C, Renaville R, Cravador A. (2001). Polymorphisms at the five exons of the growth hormone gene in the algarvia goat: possible association with milk traits. *Small Rumin. Res*. 41, 163-170.
- Mamani-Linares LW y Gallo C. (2011). Composición química y calidad instrumental de carne de bovino, llama (*Lama glama*) y caballo bajo un sistema de crianza extensia. *Rev Inv Vet* 22(4):301-311
- Maniou Z, Wallis OC, Wallis M. (2004). Episodic molecular evolution of pituitary growth hormone in *Cetartiodactyla*. *J. Mol. Evol.* 58, 743-753.
- Marín JC, Zapata B, González B, et al. (2007). Systematics, taxonomy and domestication of alpaca and llama: new chromosomal and molecular evidence. *R Ch Hist Nat* 80(2):121-140.
- Marklund L, Moller MJ, Sandberg K, Andersson L (1996). A missense mutation in the gene for melanocyte-stimulating hormone receptor (MC1R) is associated with the chestnut coat color in horses. *Mamm Genome* 7, 895–899

- Martinat N, Anouassi A, Huet JC, Pernollet JC, Segard V, Combarous Y. (1990). Purification and partial characterization of growth hormone from the dromedary (*Camelus dromedarius*). *Domest. Anim. Endocrinol.* 7, 527-535.
- McCormack BL, Chase CC Jr, Olson TA, Elsasser TH, Hammond AC, Welsh TH Jr, Jiang H, Randel RD, Okamura CA, Lucy MC.(2009). A miniature condition in Brahman cattle is associated with a single nucleotide mutation within the growth hormone gene. *Domest Anim Endocrinol.* 37(2):104-11.
- McDonald JH, Kreitman M. (1991). Adaptive protein evolution at the Adh locus in *Drosophila*. *Nature.* 351(6328):652-4.
- Mi H, Guo N, Kejariwal A, Thomas PD. (2007) PANTHER version 6: protein sequence and function evolution data with expanded representation of biological pathways. *Nucleic Acids Res* 35: 247–52
- Miltenberger RJ, Wakamatsu K, Ito S, Woychik RP, Russell LB, Michaud EJ. (2002). Molecular and Phenotypic Analysis of 25 Recessive, Homozygous-Viable Alleles at the Mouse *agouti* Locus. *Genetics.* 160(2):659-74.
- Millar DS, Horan M, Chuzhanova NA, Cooper DN. (2010). Characterisation of a functional intronic polymorphism in the human growth hormone (GH1) gene. *Hum Genomics.* 4(5):289-301.
- Mueller JP, Rigalt F, Cancino AK y Lamas H. (2010). Calidad de las fibras de camélidos sudamericanos en Argentina. *Comunicación Técnica INTA EEA Bariloche* Nro PA 573, 20 pág.
- Mullen MP, Lynch CO, Waters SM, Howard DJ, O'Boyle P, Kenny DA, Buckley F, Horan B, Diskin MG. (2011). Single nucleotide polymorphisms in the growth hormone and insulin-like growth factor-1 genes are associated with milk production, body condition score and fertility traits in dairy cows. *Genet Mol Res.* 10(3):1819-30.
- Munyard KA, (2011). Inheritance of White Colour in Alpacas, Identifying the Genes Involved. Rural Industries Research and Development Corporation, Barton, ACT.
- Nei M y WH Li. (1979). Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *PNAS* 76:5269-5273.
- Nei M y Kumar S. (2000). Molecular Evolution and Phylogenetics. *Oxford University Press*, New York (333 pp).

- Newton JM, Wilkie AL, He L, Jordan SA, Metallinos DL, Holmes NG, Jackson IJ, Barsh GS. (2000). Melanocortin 1 receptor variation in the domestic dog. *Mamm Genome*. 11(1):24-30.
- Nie Q, Sun B, Zhang D, Luo C, Ishag NA, Lei M, Yang G, Zhang X, (2005). High diversity of the chicken growth hormone gene and effects on growth and carcass traits. *J. Hered.* 96(6), 698-703.
- Ollmann MM, Lamoreux ML, Wilson BD, Barsh GS (1998) Interaction of Agouti protein with the melanocortin 1 receptor in vitro and in vivo. *Genes Devel.* 12, 316–330
- Omasits U, Ahrens CH, Müller S, Wollscheid B. (2013). Protter: interactive protein feature visualization and integration with experimental proteomic data. *Bioinformatics*. (doi: 10.1093/bioinformatics/btt607)
- Pielberg G, Olsson C, Syvänen AC, Andersson L. (2002) Unexpectedly high allelic diversity at the KIT locus causing dominant white color in the domestic pig. *Genetics* 160, 305-311.
- Polidori P, Renieri C, Antonini M, Passamonti P, Pucciarelli F.(2007). Meat fatty acid composition of llama (*Lama glama*) reared in the Andean highlands. *Meat Sci.* 75(2):356-8.
- Powell AJ, Moss MJ, Tree LT, Roeder BL, Carleton CL, Campbell E, Kooyman DL. (2008). Characterization of the effect of Melanocortin 1 Receptor, a member of the hair color genetic locus, in alpaca (*Lama pacos*) fleece color differentiation. *Small Rumin Res*, 79: 183-187
- Quispe EC, Rodríguez TC, Iñiguez LR y Mueller J.P. (2009). Producción de fibra de alpaca, llama, vicuña y guanaco en Sudamérica. *Anim Genet Resour Information*, 45, 1–14.
- Raggi LA y Ferrando G. (1998). Avances en fisiología y adaptación de camélidos sudamericanos. *Avances en Ciencias Veterinarias* 13(1). doi:10.5354/0716-260X.1998.4806
- Rees JL. (2004). The genetics of sun sensitivity in humans. *Am J Hum Genet.* 75(5):739-51.
- Rieder S, Taourit S, Mariat D, Langlois B. y Guerin G. (2001). Mutations in the *agouti* (*ASIP*), the extension (*MC1R*), and the brown (*TYRP1*) loci and their

- association to coat colour phenotypes in horses (*Equus caballus*). *Mamm Genome* 12, 450–455.
- Robbins LS, Nadeau JH, Johnson KR, Kelly MA, Roselli-Reh fuss L, Baack E, Mountjoy KG, Cone R.D. (1993). Pigmentation phenotypes of variant extension locus alleles result from point mutations that alter MSH receptor function. *Cell* 72, 827-834.
- Rossanigo C, Giulietti J, Colomer JS, Frigerio K. (1997). La llama como alternativa productiva en la provincia de San Luis. *Sitio Argentino de Producción Animal*. http://www.produccion-animal.com.ar/produccion_de_camelidos/Llamas/19-la_llama.pdf
- Royo LJ, Alvarez I, Arranz JJ, Fernández I, Rodríguez A, Pérez-Pardal L. y Goyache F. (2008). Differences in the expression of the ASIP gene are involved in the recessive black coat colour pattern in sheep: evidence from the rare Xalda sheep breed. *Anim Genet* 39, 290–293.
- Rozen S, Skaletsky HJ, (2000). Primer3 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, 365-386
- Sapag A. y Arrigo J. (2011). Clasificación del Mohair en Argentina. Avances de una herramienta para mejorar la comercialización. *Sitio Argentino de Producción Animal*. http://www.produccion-animal.com.ar/produccion_caprina/lana_caprina/10-clasificacion.pdf
- Schaufele F, West BL, Baxter JD. (1992). Synergistic activation of the rat growth hormone promoter by Pit-1 and the thyroid hormone receptor. *Mol Endocrinol*. 6(4):656-65
- Schmutz SM, Berryere TG, Ellinwood NM, Kerns JA, Barsh GS. (2003). MC1R studies in dogs with melanistic mask or brindle patterns. *J Hered*.94:69–73.
- Schmutz SM. (2005). “Chinese Shar-Pei Coat Color DNA Study”, [en línea]. 2005, Abril 2013 [13 de abril de 2013]. Disponible en la Web: <http://homepage.usask.ca/~schmutz/Shar-Pei.html>
- Solovyev VV, Shahmuradov IA, Salamov AA. (2010). Identification of promoter regions and regulatory sites. *Methods Mol Biol*. 674, 57-83.
- Sponenberg DP, Ito S, Wakamatsu K, Eng LA. (1988). Pigment types in sheep, goats, and llamas. *Pigment Cell Res*. 1(6):414-8.

- Sponenberg DP. (1997). Genetics of colour and hair texture. *In The genetics of sheep* (eds. LR Piper and A Ruvinsky) pp51-86. New York, NY.
- Sponenberg DP. (2001) .Some Educated Guesses on Color Genetics of Alpacas. *The Alpaca Registry Journal*, Vol IV, No1, Spring 2001
- Tajima, F. (1983). Evolutionary relationship of DNA sequences in finite populations. *Genetics* 105: 437-460.
- Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, and Kumar S. (2011). MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Mol Biol Evol* (10):2731-9.
- Thomas MG, Enns RM, Shirley KL, Garcia MD, Garrett AJ, Silver GA. (2007). Associations of DNA polymorphisms in growth hormone and its transcriptional regulators with growth and carcass traits in two populations of Brangus bulls. *Genet. Mol. Res.* 6, 222-237.
- Tusnády GE, Simon I. (1998). Principles governing amino acid composition of integral membrane proteins: application to topology prediction. *J Mol Biol.* 283(2):489-506.
- Valbonesi A, Apaza N, La Manna V, Gonzales ML, Huanca T, Renieri C. (2011). Inheritance of white, black and brown coat colours in alpaca (*Vicuna pacos L.*). *Small Rumin. Res.* 99, 16–19.
- VanderHeyden TC, Wojtkiewicz PW, Voss TC, Mangin TM, Harrelson Z, Ahlers KM, Phelps CJ, Hurley DL. (2000). Mouse growth hormone transcription factor Zn-16: unique bipartite structure containing tandemly repeated zinc finger domains not reported in rat Zn-15. *Mol Cell Endocrinol.* 159(1-2):89-98.
- Vidal-Rioja L, Zambelli A y Semorile L. (1994). An assessment of the relationships among species of *Camelidae* by satellite DNA comparisons. *Hereditas* 121: 283-290.
- Vrieling H, Duhl DM, Millar SE, Miller KA, Barsh GS. (1994). Differences in dorsal and ventral pigmentation result from regional expression of the mouse agouti gene. *Proc Natl Acad Sci USA.* 91(12):5667-5671
- Wallis M. (1996). The molecular evolution of vertebrate growth hormone: a pattern of near-stasis interrupted by sustained bursts of rapid change. *J. Mol. Evol.* 43, 93-100

- Wallis M, Lioupis A, Wallis OC. (1998). Duplicate growth hormone genes in sheep and goat. *J Mol Endocrinol.* 21(1):1-5.
- Wang GD, Cheng LG, Fan RX, Irwin DM, Tang SS, Peng JG, Zhang YP.(2013). Signature of balancing selection at the MC1R gene in Kunming dog populations. *PLoS One.* 8(2):e55469.
- Watterson, GA. (1975). On the number of segregating sites in genetical models without recombination. *Theor. Pop. Biol.* 7: 256-276.
- Wheeler JC. (1991). Origen, evolución y status actual. En: Fernández-Baca, S. (ed) *Avances y perspectivas del conocimiento de los Camélidos Sudamericanos*. FAO. Santiago, Chile. 429 pp.
- Wheeler JC, Russel AJF y Stanley HF. (1992).A measure of loss: prehispanic llama and alpaca. *Arch. Zootec.* 41 (extra): 467-475. 1992.
- Wheeler JC. (1995). Evolution and present situation of the South American Camelidae. *Biol J Linn Soc.* 54:271-295.
- Yu B y Millhauser GL. (2007). Chemical disulfide mapping identifies an inhibitor cystine knot in the agouti signaling protein. *FEBS Letters* 581, 5561 5565.

ANEXOS

Protocolo modificado de extracción de ADN con Cloruro de Litio a partir de sangre

Para muestras de 3 a 5 ml de sangre anticoagulada con una solución de citrato de sodio 0.129M se agregó:

- 1) 14 ml de Buffer A (0,32M Sacarosa, 0,01M Tris-HCl pH8, 0,005M Cl_2Mg , 1% Tritón X100 y agua estéril). Se mezcló por inversión 10 veces y luego se incubó en hielo 10'.
- 2) A continuación las muestras se centrifugaron durante 30 min. a 4000 rpm, 4°C.
- 3) Se descartó el sobrenadante y luego se le agregó a cada pellet 13 ml de Buffer A. Seguidamente, se agitó en vortex hasta despegar el pellet del fondo del tubo y se logró homogeneizarlo.
- 4) Nuevamente, se centrifugaron las muestras durante 30 min. a 4000 rpm, 4°C y se descartó el sobrenadante.

Se observó el color del pellet. Si el pellet presentó una coloración blanco-amarillento, se procedió con el punto 5. Si por el contrario, la coloración fué rojizo-amarronada, se realizó otro lavado con 13 ml de Buffer A, repitiendo las condiciones de arriba y luego se pasó al punto 5.

- 5) El pellet se resuspendió en Buffer de Digestión (100mM ClNa, 50mM Tris-HCl, 1% SDS, 50mM EDTA pH8 y agua estéril) (300 μ l de Buffer de Digestión por cada ml de sangre) y se agregaron 20 μ l de proteinasa K (10mg/ml). Se realizó una incubación de las muestras a 45°C durante 2 hs y luego overnight a 37°C.
- 6) Al mismo tubo de incubación, se agregaron 300 μ l de LiCl 5M por cada ml de sangre, mezclándolo por inversión durante 1 min. Luego se agregaron 600 μ l de mezcla SEVAG (cloroformo:isoamílico 24:1) por cada ml de sangre y se agitó el tubo durante 30 min. Se repitió la centrifugación a 4000 rpm durante 25-30 min. Sin tocar ni levantar la interfase se trasvasó el sobrenadante con el ADN en solución a otro tubo cónico de 15ml.
- 7) Se agregaron 6 ml de 2-PROPANOL frío; practicando movimientos envolventes hasta que el DNA precipitó. Con micropipeta de 1000 μ l se aspiró el precipitado de ADN y se lo colocó en tubo Eppendorf de 1,5ml.

- 8) El ADN extraído se lavó con 1 ml de Etanol 70%, se centrifugó 10-15 min a 13000 rpm y se descartó el alcohol sobrenadante, repitiendo este paso una vez mas.
- 9) Se dejó reposar unos minutos hasta evaporación total del alcohol.
- 10) El ADN se resuspendió en 100 µl de TE (10mM Tris-HCl, 1mM EDTA pH8 y agua estéril) y se guardó a 4°C hasta su uso.

Purificación de las reacciones de PCR por precipitación con PEG.

1. A 20 µl de producto de PCR se le agregaron 20 µl de una solución de 20% PEG-2,5 M NaCl y luego la mezcla se incubó durante 15 minutos a 37°C.
2. Se centrifugó a 13.000 rpm durante 20 minutos a temperatura ambiente.
3. El sobrenadante se descartó con pipeta. El pellet es incoloro y queda adherido a la pared del tubo.
4. Se agregaron 50 µl de etanol 70% suavemente por la pared del tubo y se dejó reposar 1 minuto. Luego, con pipeta, se descartó el sobrenadante para eliminar la mayor cantidad posible de etanol. Se centrifugó 20 min a 13.000 rpm.
5. El pellet se secó a 37°C durante 10-15 minutos; asegurándose que el pellet estuviera seco sin restos de etanol.
6. Se resuspendió el pellet en 25 µl de agua bidestilada estéril con pipeta o vortex a temperatura ambiente o 37°C. y por último se midió la concentración del producto purificado.

Figura. 1

```

1      AAAAAGAGAACAGATTGGGTGGTGTCTCACACAGATGGACCCTGCGTGTACAAACCTCAG
Gene  -----
5'UTR -----

61     GGCTGGTGACAGGGGCAAGGGGAAGATGACAAGCCTGGGGGACATGACCCAGAGGAGGA
Gene  -----
5'UTR -----

121    GCGGGGACAGGATGAGTGGGAGGAGTTCTAAATTATCCATTAGCACAGGCCGGTCAGCG
Gene  -----
5'UTR -----

181    GCCCATGCATAAATGTATAGAAAATAAGTGGGGCAGAGGGAGAGAGAGGAGGCCAGGC
Gene  -----
5'UTR -----

241    ATAAAAAGGGCCCACCAGGGACCAATTCAGGATCCCAGGGCCTAGCTCCCCAAACCGCT
Gene  -----
5'UTR ----->

```

```

1
-----
301 CAGGGTCCTATGGACAGCTCGCCAGCTGTGATGGCTGCAGGTAAGTGCCTAAAATCCCC
Gene
1 -----
CDS ----->
CDS ----->
A M A A -----

361 TTAGGCTTGATGTGTACAGAAGGGTGTGTGGGGCCCTGCAGATGGATAGGGCACTAAC
Gene
A -----

421 CTTGGCCTTTGGGGCTTCTGAATGTGAGCGTGGATATCTATGCCACATATTTGGCTACG
Gene
A -----

481 TTTTAGAAAGGAAAGGCCTTGGAGCAGAGAGAGGGCTGGCAGGAGACGAGGCCTCTGGG
Gene
A -----

541 TCTCCGGGCCCTTCTCTCGCTGGCCCTCCGGTTGTCTCTTAGGCCCTCGGACCTCCATG
Gene
CDS -----
CDS ----- G P R T S M
A ----->
2 -----

601 CTCCTGGCTTTCACCCTGCTCTGCCTGCCCTCAGGAGCGGGTGCCTTCCCAGCC
Gene
CDS -----
CDS ----- L L A F T L L C L P W P Q E A G A F P A
2 -----

661 ATGCCTCTGTCCAGCCTGTTTGCCAACGCTGTGCTCCGCGCCCAGCACCTGCACCAGCTG
Gene
CDS -----
CDS ----- M P L S S L F A N A V L R A Q H L H Q L
2 -----

721 GCTGCTGACACCTACAAAGAGTTTGTAACTCCTCAGGGATGGGTGCTAGTGGAGGGTGG
Gene
CDS ----->
CDS ----- A A D T Y K E F
2 ----->
B -----

781 CAGGAAGGGTGAACCCACCCCTCTGCATAATGGGAGGAACTAACAAGTTCAGGGGT
Gene
B -----

841 ATCTTATCCAAGTGAAGATGCTGTGAGGTGAGCATAAACTGAGGGAGGGGGTTCTGCAT
Gene
B -----

901 AAAGCAGTGAGGAGGACAGTGCACCAGCTCAGATCTGGTGCGGGTGTTCCTTTGTCCAGG
Gene
B ----->

961 AGCGCACCTACATCCCGGAGGGACAGAGATACTCCATTCAGAACGCCAGGCTGCCTTCT
Gene
CDS -----
CDS ----- E R T Y I P E G Q R Y S I Q N A Q A A F
3 -----

1021 GTTTCTCGGAGACCATCCCGGCCCCACAGGCAAGGACGAGGCCAGCAGAGATCGGTGA
Gene
CDS ----->
CDS ----- C F S E T I P A P T G K D E A Q Q R S
3 ----->
C -----

1081 GTGGTCATCGCCCGCCGAGGAGCAGGGACCTCCTTCTTCTAAGAATGTTGCCCCA
Gene
C -----

1141 TCTCTTCACTGGATCCTGGGCAGCCTTCTCTCCAAGGCGGGCGGGTGTGGGATGG

```

```

Gene
C
-----

1201
Gene
C
-----
CGGCGGAGGATGGTGGGTGGCCTGAGCCCGCAGCACCCACCGCCCCACTTCGGTCCCG
-----

1261
Gene
CDS
C
4
-----
AGGACGTGGAGCTGCTCCGCTTCTCGCTGCTGCTCATCCAGTCTTGGCTCGGGCCTGTGC
-----
      D V E L L R F S L L L I Q S W L G P V
      >
-----

1321
Gene
CDS
C
4
-----
AGTTCCTCAGCAGGCTTTCACCAACAGCCTGGTGTGGTGGCACCTCGGACCGCTCTATG
-----
      Q F L S R V F T N S L V F G T S D R V Y
-----

1381
Gene
CDS
C
4
D
-----
AGAAGCTGAAGGACCTAGAGGAAGGCATCCAGGCCCTGATGCGGGTGGGGATGGCCGTCG
-----
      >
      E K L K D L E E G I Q A L M R
      >
-----

1441
Gene
D
-----
TGGGTCCCCTATCTGGCCCCAGGCCTGCCCTCTCCTGCCTTAGCCGAGGGGTGGGGGGCT
-----

1501
Gene
D
-----
AAGTGGGCTGGGAGAGAGGCGCCCTGCTCTGTCTGTAGCGTCCAGCCTGGACCCAGGA
-----

1561
Gene
D
-----
GAAATCTTTTCCCATTTCCCTTTTGAATGCTTCTCCTTGCTCTTTTCCAAGCCTGGA
-----

1621
Gene
D
-----
GGGGAGGGTGGGAAGTGGAGGGGAAGGGAAGGAGCGACTCCCAAGGACTCGGCCTCTCTG
-----

1681
Gene
CDS
C
D
5
-----
TCTCTCCCTGTCTTTTGCAGGAGCTGGAAGATGGCAGCCCCGGGCTGGGCAGATCCTCA
-----
      >
      E L E D G S P R A G Q I L
      >
-----

1741
Gene
CDS
C
5
-----
GGCAAACCTACGACAAGTTTGACACAACTTGCAGTGTGATGACGCGCTGCTCAAAAAC
-----
      R Q T Y D K F D T N L R S D D A L L K N
-----

1801
Gene
CDS
C
5
-----
ACGGGCTGCTCTCCTGCTTCAAGAAGGACCTGCACAAGGCTGAGACCTACCTGCGGGTCA
-----
      Y G L L S C F K K D L H K A E T Y L R V
      ■
-----

1861
Gene
CDS
C
5
3'UTR
-----
TGAAGTGTGCGCCGCTTTGTGGAGAGCAGCTGTGCCTTCTAGTTGCTGGGCAATCTGTTAC
-----
      >
      M K C R R F V E S S C A F
      >
-----

1921
Gene
3'UTR
-----
CCCTCCCAGCGCCTCCCCTGACCCTGGAAAGTGCCACTCCAGTGCCACCACCCTTTCC
-----

1981
Gene
3'UTR
-----
TAATAAAATGG
      >
      >

```

Fig. anexa 1. Secuencia completa del gen GH1 de Llama, regiones adyacentes y proteína deducida (HM921333). La secuencia de aminoácidos de la proteína se muestra debajo de la secuencia de nucleótidos, en código de una letra. La caja TATA (CATAAAA) y el sitio de poliadenilación (AATAAAA) están subrayados. El asterisco (*) indica el sitio de inicio de la transcripción y el cuadrado negro (■), codón de stop. En la columna de la izquierda: los números 1-1981 indican la longitud de la secuencia. Las letras A-D, las regiones intrónicas y los número 1-5 indican las regiones exónicas. La abreviatura CDS hace referencia a la región codificante.

Tabla 1. Polimorfismos del gen MC1R: ubicación nucleotídica y frecuencias alélicas

SNP	Frecuencias alélica
c.82A>G	0.964/0.036
c.92C>T	0.964/0.036
c.112G>A	0.951/0.049
c.126T>C	0.939/0.061
c.205C>A	0.964/0.036
c.259G>A	0.512/0.488
c.376G>A	0.549/0.451
c.383T>C	0.817/0.183
c.587T>C	0.964/0.036
c.618G>A	0.951/0.049
c.638G>A	0.927/0.073
c.901C>T	0.988/0.012
c.933G>A	0.939/0.061
c.*5T>C	0.951/0.049

Los números de SNPs hacen referencia a la ubicación en la secuencia de ADN codificante “c.”

Figura 2

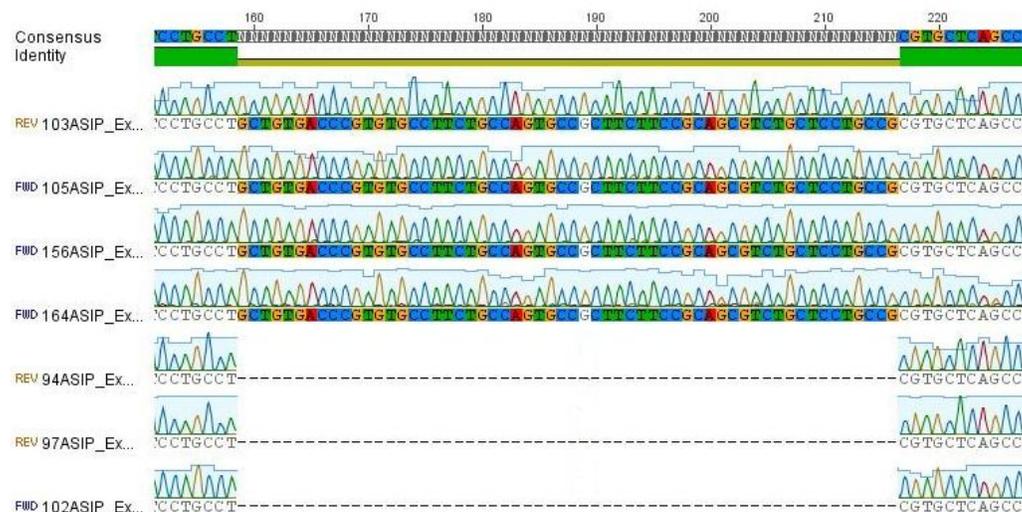


Figura 2. Electroferograma que muestra un alineamiento de secuencias del exón 4 de ASIP deleciónado y sin deleciónado en las Llamas. La deleción está representada por líneas.