

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS

FACULTAD DE FARMACIA Y BIO QUÍMICA

E.A.P. DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA

**Aplicación de la técnica del ADN polimórfico amplificado
al Azar (RAPD) en el estudio molecular de Lama pacos**

TESIS

para optar el Título Profesional de Químico Farmacéutico

AUTOR

Conrad Ortiz Alfaro

ASESOR

Amparo I. Zavaleta Pesantes

Lima – Perú

2004

..	1
AGRADECIMIENTOS .	3
ABREVIATURAS . .	5
RESUMEN .	7
ABSTRACT .	9
I. INTRODUCCIÓN . .	11
II. ANTECEDENTES DEL PROBLEMA .	13
2.1. Importancia del problema .	14
III. GENERALIDADES .	17
3.1.ASPECTOS GENERALES DE LA ALPACA (<i>L. ama pacos</i>) .	17
3.1.1 EVOLUCIÓN .	17
3.1.2 DISTRIBUCIÓN Y ECOLOGÍA .	19
3.1.3 RAZAS Y FIBRA DE ALPACAS .	20
3.1.4 HIBRIDACIÓN .	22
3.1.5 CITOGENÉTICA Y POLIMORFISMOS .	23
3.2 ASPECTOS GENERALES DE LAS TÉCNICAS BIOMOLECULARES .	24
3.2.1 Reacción en cadena de la polimerasa .	24
3.2.2 ADN polimorfo amplificados al azar (RAPD) . .	30
3.2.3 Ejemplos del uso del RAPD . .	31
IV. MATERIALES Y MÉTODOS .	35
4.1 Materiales . .	35
4.1.1 Material biológico . .	35
4.1.2 Soluciones . .	38
4.2 Métodos .	39
4.2.1 Toma de muestra .	39
4.2.2 Extracción del ADN genómico .	40
4.3 RAPD .	40

4.3.1 Características de oligonucleotidos . .	41
4.3.2 Procedimiento de la técnica del RAPD . .	42
4.3.3 Análisis de resultados .	42
V. RESULTADOS .	45
5.1. Extracción del ADN Genómico . .	45
5.2. Estandarización del RAPD .	47
5.3. Identificación de Cebadores informativos . .	47
5.4. Estudio Molecular de <i>Lama pacos</i> con cebadores informativos .	48
VI. DISCUSIÓN .	53
CONCLUSIONES . .	57
RECOMENDACIONES .	59
BIBLIOGRAFÍA .	61

A Dios, a mis padres Vidal y Maura; a mis hermanas Sonia y Marilin; a Julia, Nathaly, José, Italo y Jesús; Muchas Gracias por todo su apoyo, cariño y comprensión durante todo este tiempo.

AGRADECIMIENTOS

Agradecimientos a:

Los miembros del Jurado Examinador y Calificador:

Presidenta:

Dra. María Elizabeth Gonzáles Loayza

Miembros:

Q.F. Gloria Gordillo Rocha

Q.F. Gustavo Guerra Brizuela

Dr. Víctor L. Izaguirre Pasquel

Por sus sugerencias y consejos que han permitido enriquecer este trabajo.

Un agradecimiento especial a:

Dra. Amparo I. Zavaleta Pesantes.

Con sus consejos y tiempo invertidos en el asesoramiento de este trabajo permitieron la ejecución y el termino de esta tesis.

Dr. Raúl Rosadio Alcántara.

Por su apoyo y sugerencias dados en el presente trabajo

A Edith Tafúr y familia por brindarme su amistad y cariño inmerecidos.

A la Dra. Luisa Negron, por su constante apoyo.

A la Dra. Jane Wheeler, por sus consejos y confianza depositada en mi.

A los miembros de CONOPA, además de investigación encontré grandes amigos.

Al Dr. Fernando Quevedo, por su apoyo y amistad.

Al Mg. Carlos Bell y familia, por su incondicional amistad brindada.

A Alfredo Mendoza, Por ser uno de mis mejores amigos y compañero en la universidad.

A la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la UNMSM, donde encontré un segundo hogar.

ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
dNTP	Desoxi nucleotido tri fosfato
CONOPA	Coordinadora de Investigación y Desarrollo de Camélidos sudamericanos
EDTA	Etilen diamino tetra acético
M	Marcador de peso molecular
pb	Pares de bases
PCR	Polymerase chain reaction (reacción en cadena de la polimerasa)
RAPD	Random Amplified Polimorfic DNA (polimorfismo amplificado al azar)
TAE	Tris Acetato EDTA
TE	Tris EDTA
TBE	Tris Borato EDTA
U	Unidades
UI	Unidades Internacionales

RESUMEN

Se aplica la técnica del ADN polimorfo Amplificado al Azar (RAPD) se aplica al estudio molecular de *Lama pacos* (alpaca), esta metodología se propone debido a que las técnicas de microsatélites y ADN mitocondrial, que actualmente se utilizan, no tienen un uso práctico cuando se trata de analizar gran cantidad de muestras.

Para la estandarización del RAPD se utilizó ADN genómico a partir de sangre total y cebadores de 10 nucleótidos siguiendo los protocolos estandarizados modificando básicamente la concentración de $MgCl_2$ a 2.5 mM permitiendo aumentar la intensidad de las bandas y una mejor visualización. Se prosiguió con la identificación de cebadores informativos, de 23 cebadores fueron seleccionados 7 (OPF-05, OPI-04, OPB-03, OPI-18, OPB-11, OPA-18 y OPI-14) por generar numerosas bandas por muestras analizadas. Estos cebadores permitieron obtener perfiles diferentes entre alpacas híbridas y puras; en la muestra poblacional estudiadas no se encontraron alpacas que tuvieran un perfil de bandas similares a los presentados por los animales puros, esto explicaría el grado de hibridación que existe debido a un inadecuado cuidado en el cruce, esto trae como consecuencia, por ejemplo, una baja calidad en la producción de fibra por las alpacas y llamas híbridas disminuyendo el ingreso económico para las familias campesinas. En 8 alpacas los cebadores OPB-03 y OPA-18 mostraron bandas polimórficas de 650 pb y 1000 pb respectivamente, este polimorfismo nos podría indicar alguna mutación o variabilidad intraespecífica, ya que estos animales no presentan diferencias fenotípicas evidentes.

Palabras claves: *Lama pacos*, RAPD, ADN genómico, decanucleótido, suri, huacaya.

ABSTRACT

The Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) is applied on the molecular study of *Lama pacos* (Alpaca), this methodology is proposed because the microsatellites and DNA mitochondrial techniques, which are used commonly, don't have a practical utility when is necessary to analyze great quantity of samples.

Genomic DNA obtained from total blood and primers of 10 nucleotides were used to standardize the RAPD technique following the standardized protocols, and concentration of MgCl₂ was modified at 2.5 mM which allowed an increase at the intensity and a better visualization of the bands. After the standardization, the identification of informative primers was realized, beginning with 23 primers, selecting only 7 (OPF 05, OPI 04, OPB 03, OPI 18, OPB 11, OPA 18 and OPI 14), because the presence of several bands for the analyzed samples. These primers let obtain different profiles between hybrid and pure alpacas; in the sample were not found alpacas with a similar bands profiles to those presented by the pure animals, this would explain the hybridization grade that exists due to an inadequate care in the crossing, this results in, for example a low quality in the fiber production from the hybrid alpacas and llamas, diminishing the economic entrance for the rural families. In 8 alpacas the primers OPB-03 and OPA-18 showed polymorphic bands of 650 pb and 1000 pb respectively, this polymorphism could indicate some mutation or intraespecific variability, since these animals don't present evident phenotypic differences.

Key words: *Lama pacos*, RAPD, genomic DNA, decanucleotid, suri, huacaya.

I. INTRODUCCIÓN

Los camélidos sudamericanos descienden de un ancestro extinto (Paleollama), cuyo hábitat fue América del Norte. Actualmente los camélidos sudamericanos comprenden 4 especies: 2 silvestres y 2 domesticas. La descendencia de las especies domésticas (llama y alpaca) es controvertida; la hipótesis planteada es que el guanaco sería el ancestro de la llama y la alpaca, y que la vicuña nunca ha sido domesticada; esta controversia es tema de investigación en los últimos 20 años y oportunidad para desarrollar técnicas moleculares.

El primer secuenciamiento de ADN de camélidos sudamericanos fue publicado por Stanley⁴⁷, en este trabajo se determinó la evolución y las relaciones taxonómicas utilizando el ADN mitocondrial, específicamente la secuencia del citocromo b y los microsatélites presentes en el ADN Nuclear. Del análisis de secuencia se determinó que la llama desciende del guanaco y la alpaca es la forma domesticada de la vicuña. Además han ocurrido repetidos eventos de hibridación a través del tiempo originando que sólo el 20% de alpacas y 60% de llamas sean genéticamente puras.

El desarrollo de técnicas moleculares rápidas para el estudio de los camélidos sudamericanos permitirá a científicos tener herramientas alternativas para mejorar las especies, mejora que fue interrumpida por la conquista española la cual produjo una masiva mortalidad no solo de pobladores sino de camélidos domesticados (aproximadamente 90%), los supervivientes se desplazaron a zonas muy altas, los cuales eran lugares muy inhóspitos para los conquistadores europeos. En este proceso, muchos de los conocimientos actuales preservados por los campesinos para el cuidado y manejo

de camélidos sudamericanos fueron transmitidos oralmente, conocimiento que cambio a través del tiempo trayendo consigo un entrecruzamiento arbitrario.

La técnica del ADN Polimorfo Amplificado al Azar (RAPD) se basa en el uso de cebadores cortos mayores de 9 bases con la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)⁵⁷. El RAPD se ha utilizado con gran éxito en la caracterización de organismos de diferentes orígenes y grados evolutivos, así por ejemplo, cepas bacterianas⁶³, mamíferos¹⁶, peces⁵⁰ y anfibios⁵⁰. Esta técnica es especialmente útil en la caracterización de la primera generación de híbridos de generaciones posteriores entre especies genéticamente diferentes.

En alpacas, el uso combinado de la secuenciación del citocromo b y por lo menos 4 microsatélites reportado por Kadwell²⁵ constituyen herramientas biomoleculares pero a la vez no tiene un uso práctico cuando se trata de analizar un número grande de muestras, éstas requieren equipos costosos y sofisticados, alta capacitación técnica además de ser muy laboriosos y consumir mucho tiempo. El desarrollo de la técnica del RAPD puede ser una alternativa que permitirá descartar animales híbridos y conservar los puros, estableciendo rebaños de animales con ciertas características en un menor tiempo y con menos complicaciones técnicas.

1.1. Objetivo general

Aplicación de la técnica del ADN Polimorfo Amplificado al Azar (RAPD) para el estudio molecular de *Lama pacos* (alpaca).

1.2. Objetivos específicos

1. Estandarizar la técnica del ADN Polimorfo Amplificado al Azar (RAPD)
2. Seleccionar cebadores específicos e informativos que generen perfiles genéticos diferentes.
3. Correlacionar los resultados de las pruebas moleculares con las características fenotípicas de las alpacas estudiadas.

II. ANTECEDENTES DEL PROBLEMA

En el año 1999 se reportó el primer análisis evolutivo molecular de la familia *Camelidae*, por análisis de la secuencia del citocromo b de origen mitocondrial y se estimó por el tiempo de divergencia de las tribus del viejo mundo (*Camelini*) y el nuevo mundo (*Lamini*), encontrándose una divergencia de 17,3-19,6%, este dato sugiere que la tasa promedio de sustitución de nucleótidos es de 1,6 a 1,8% por millones de años. Los datos de la secuencia de ADN, también fueron utilizados para probar las actuales hipótesis concernientes a los ancestros de los animales domesticados llama y alpaca. Los resultados muestran que la hibridación ha ocurrido en los ancestros de ambos siendo posible, como resultado de este trabajo, que la alpaca verdaderamente se origine como una forma domestica de la vicuña^{25,47}.

A pesar de estos estudios los orígenes de las alpacas y llamas domésticas sudamericanas son controvertidos debido a la hibridación cercana a la extinción durante la conquista española y las dificultades en la interpretación arqueológica. Tradicionalmente el ancestro de ambas formas, alpaca y llama, es atribuido al guanaco. Mientras se asume que la vicuña nunca ha sido domesticada. Estudios recientes han relacionado la alpaca a la vicuña, señalando su domesticación de 6000 a 7000 años en los andes peruanos⁵⁹. Se determino en detalle las relaciones genéticas entre los camélidos sudamericanos para determinar los orígenes de las formas domesticas, utilizando ADN mitocondrial y microsatélites. El análisis de ADN mitocondrial ubica, con un 80% de probabilidad, las secuencias genéticas de la llama y alpaca en el linaje del guanaco. Examinaron también 4 microsatélites en vicuña salvaje y guanaco de procedencia conocida; en contraste al ADN mitocondrial, los marcadores microsatelitales

mostraron alta similitud genética entre alpaca con vicuña, y llama con guanaco⁴⁷. Finalmente, el análisis combinado de marcadores en otro grupo de muestras confirmó la interpretación de los microsátélites y sugirió que la alpaca descende de la vicuña, y que podrían ser reclasificada como *Vicugna pacos*. Este resultado es importante para el manejo futuro de los camélidos domésticos y salvajes en sudamérica⁵⁸.

2.1. Importancia del problema

Hay tres formas de comercialización de la alpaca: como animal vivo, la venta de su carne y fibra.

A fines de la década de los 50, la producción mundial de mohair bordeaba 25.000 ton, siendo los Estados Unidos de América el mayor productor, donde ahora ha perdido vigencia; Por la misma época se producían alrededor de 2.000 ton/año de cashmere limpio, lo que no parece haberse incrementado, aunque la información de los países productores, como China, India y Mediano Oriente no son claras. Algunos países tradicionalmente productores de lana, como Australia, Nueva Zelanda y Argentina han incursionado en este rubro. En este panorama, la importancia de la fibra de alpaca decae no solamente por la tendencia del bajo consumo de fibras animales en el mundo, sino también por la falta de mejoramiento. En el Perú, como mayor productor, no existe mucho interés empresarial por la crianza y mejoramiento de alpacas, debido a que no se ha desarrollado la industria textil y hay poco incentivo económico^{52,53}.

En la producción de alpaca y llama todavía no se dan tales condiciones. No obstante, antes de los cambios ocurridos en la ovejería de Australia y la textilera inglesa, muchas medidas de mejoramiento se demostraron como factibles de ser aplicadas a la alpaca, entre ellas la esquila anual, clasificación por finura y longitud, incremento del color blanco, etc. A pesar de todo ello la modernización en la industria alpaquera es todavía incipiente⁵².

Las fibras de alpaca y llama pueden tener una utilización textil más variada, siempre que se oferten en volúmenes significativos, bajo especificaciones y normas técnicas, así por ejemplo el valor total exportado de fibra en 1998 asciende a 1903.8 ton con un valor US\$ 23.8 millones, siendo superior al valor de fibra exportada en 1997 que fue de 1,606 ton. con un valor de US\$ 12 millones⁴⁵.

Los mayores volúmenes colocados y el aumento del precio en 12% en promedio durante 1998, explican este comportamiento. El precio promedio fue de US\$ 7/Kg dependiendo éste de la calidad de fibra. Los principales mercados a los que se dirige la fibra son: China (41%), Italia (30%) y Reino Unido (12%) y para el hilado se tiene como principales mercados a Brasil y Chile⁴⁵.

Cabe señalar que en los próximos años los países importadores, Australia, China y Nueva Zelanda aumentarán la producción interna de alpacas, debido a que en 1991 y 1992 importaron de Perú ejemplares de camélidos para su reproducción masiva. Cuando Perú prohibió la exportación de ejemplares vivos, esos países adquirieron tejidos para

lograr, por medios genéticos, mejorar sus ejemplares. Australia, China y Nueva Zelanda tienen aproximadamente 300.000 alpacas, sometidas a proceso genético para mejorar la calidad de fibra. Dentro de 10 años tendrán entre 10 y 12 millones, más del doble de las que tiene Perú².

En el año 2002 la venta de fibra disminuye notablemente, por esto los criadores tuvieron que sacrificar alpacas para vender su carne. En el 2003 existían 3 millones de alpacas frente a los 3.2 millones que habían en el 2002. El consumo de carne se ha duplicado ante una escasa venta de la fibra. En el año 2002 se llegó a exportar entre 600 y 700 cabezas de alpacas, teniendo un precio que fluctuaba entre US\$ 1,000 y US\$ 1,500 por alpaca. La alpaca se exporta con fines de crianza y reproducción para posteriormente utilizar su fibra².

En el mercado externo, principalmente Estados Unidos, Australia y Nueva Zelanda, la venta de alpacas se realiza mediante subastas que normalmente es de 1,800 animales al año; sin embargo la demanda del auquénido en el mercado externo decreció debido al clima de esos países. Actualmente se están exportando entre 600 y 700 cabezas como máximo, teniendo un precio de subasta para exportación que fluctúa entre US\$1,000 y US\$1,500 por alpaca.

Según el Instituto Peruano de la alpaca en el Perú 95% de las alpacas está en manos de 167.000 familias campesinas, cada una de las cuales tienen 70 animales promedio, cada familia obtiene unos 600 dólares anuales promedio por la venta de la fibra.

Por encima de los 4.000 metros no hay vegetación ni agricultura, y casi la única actividad posible es la ganadería, pero no la vacuna ni la ovina, dada la escasez, dureza y pobreza de los pastos naturales. Los únicos animales que subsisten allí son los camélidos oriundos de la cordillera de los Andes: alpacas, guanacos, llamas y vicuñas, de hábitos alimenticios tan frugales².

La fibra de alpaca posee características textiles potenciales, sería un error insistir en los usos tradicionales a que se destinan estos productos en el exterior, soslayando la realidad.

La alpaca debe ser mejorada sobre la base de investigaciones genéticas para obtener productos derivados con mayor y mejor calidad que debería ser la base de un manejo sostenible y adecuado de la alpaca dando lugar a mejorar el precio no sólo del mercado interno sino también externo de sus productos derivados, trayendo como consecuencia la mejora de las condiciones de vida de la población que comparte las heladas alturas andinas con los camélidos, uno de los sectores sociales más deprimidos del país.

Para que las investigaciones sean un verdadero instrumento del desarrollo de los camélidos, es necesario que esta responda a objetivos muy concretos y esté enmarcada dentro de un esquema general de progreso, con prioridades claramente establecidas. Desde el punto de vista social, dado que los camélidos domésticos cumplen una función socioeconómica muy importante, por constituir el medio de vida de un vasto sector de la población altoandina, la investigación debe estar dirigida a mejorar el nivel de vida de esa población mediante una producción más eficiente. Además debemos ser conscientes que

dichas investigaciones deben ser acordes con la realidad, es decir si queremos mejorar genéticamente alpacas se debe buscar metodologías que sean rápidas y económicas, características que cumple el RAPD frente a estudios como microsatélites o el estudio del ADN mitocondrial que utilizan relativamente mas tiempo, necesitan un mayor nivel técnico haciéndolos menos económicos. Por esta razón, la aplicación de la técnica del RAPD puede ser una alternativa, nos dará la capacidad para descartar en el futuro, por ejemplo, animales híbridos y conservar los puros, esta técnica podría brindar marcadores genéticos para establecer rebaños de animales con ciertas características en un menor tiempo y con menos complicaciones técnicas. Esto es muy importante debido a que el 80% de las alpacas actuales son híbridas, siendo además prácticamente imposible la identificación de animales puros en base solo a características fenotípicas.

III. GENERALIDADES

3.1. ASPECTOS GENERALES DE LA ALPACA (*Lama pacos*)

3.1.1 EVOLUCIÓN

Los camélidos sudamericanos se clasifican taxonómicamente en el orden Artiodactyla suborden Tylopoda y familia Camelidae. A nivel de tribu se dividen en *Lamini* y *Camelini*, y a nivel de género en *Lama* y *Vicugna*, para animales del nuevo mundo, y *camelus* para los del viejo mundo (Tabla N° 1).

Tabla N° 1. Descripción taxonómica de *Lama Pacos* (alpaca)

CATEGORÍA	TAXA	DESCRIPCIÓN
Reino	Animalia	Animales: Sistemas multicelulares que se nutren por ingestión.
Subreino	Eumetazoa	Animales con cuerpo integrado por dos o más lados simétricos.
Rama	Bilateria	Cuerpo con simetría bilateral con respecto al plano sagital.
Filo	Chordata	Cordados: Animales con médula espinal, o cordón nervioso.
Subfilo	Vertebrata	Vertebrados: Cordados con columna vertebral.
Superclase	Gnathostomata	Vertebrados con mandíbulas.
Clase	Mamalia	Mamíferos: Poseen pelos en la piel.
Orden	Artiodactyla	Mamíferos de Pezuñas Pares
Familia	Camelidae	Camellos
Tribu	Lamini	Camélidos Sudamericanos
Género	Lama	llama, alpaca y guanaco
Especie	Lama pacos	alpaca

Ambas tribus se originaron en América del Norte durante el plioceno. Al final de este periodo, hace unos 3 millones de años, los *Camelini* migraron al Asia y los *Lamini* a América del Sur⁵⁶, donde habitaron en zonas áridas y semiáridas utilizando funciones anatómo-fisiológicas especializadas para adaptarse al estrés térmico, deshidratación e hipoxia producida por la altura en el caso de los camélidos sudamericanos. Actualmente existen cinco especies: llama (*Lama glama*), alpaca (*Lama pacos*), vicuña (*Lama vicugna*) en el nuevo mundo, dromedario (*camelus dromedario*) y el bactriano (*Camelus bactrianus*) en el viejo mundo³¹ (Gráfico N°1).



Gráfico N° 1. Origen evolutivo de los camélidos sudamericanos.

La interpretación de los estudios realizados por Jane Wheeler y Raúl Rosadio de Coordinadora de Investigación y Desarrollo de Camélidos Sudamericanos, sugirieron que la alpaca es una forma domestica de la vicuña. (**Foto:** Cortesía Jane Wheeler)

3.1.2 DISTRIBUCIÓN Y ECOLOGÍA

Desde su domesticación, hace 6.000 años en las punas centrales del Perú⁶⁰, la crianza de alpacas fue llevado por el hombre a los valles interandinos hace 3.800 años, según las evidencias procedentes de los sitios arqueológicos de Cotos (Huanuco) a 1.900 m.s.n.m.⁶² y de Huacaloma (Cajamarca) a 2.700 m.s.n.m. Finalmente, es probable que se extendiera a las costas del norte⁴⁶ y del sur hace 900 a 1000 años. A consecuencia de la invasión española del siglo XVI, tanto las alpacas como las llamas fueron diezmadas y desplazadas de la costa y los valles interandinos hacia las elevaciones más altas de los Andes¹⁴. Actualmente la distribución de la alpaca se extiende desde Cajamarca (de reciente reintroducción) y el norte del departamento de Ancash, hasta el Lago Poopo, en Bolivia, norte de Chile y noroeste de Argentina. En toda esta área se localizan elevaciones de 4.000 m.s.n.m. o superiores. Aunque no existen evidencias paleontológicas²⁰, ni arqueozoológicas³⁵, de la presencia de alpacas en Ecuador, en 1987 se ha introducido alpacas chilenas a los Andes ecuatorianos²⁷ (Gráfico N° 2 y N° 3).



Gráfico N° 2 Distribución actual y prehispánica de alpacas en Sudamérica.

Fuente: entrega personal Dra. Jane Wheeler, Dr. Raul Rosadio

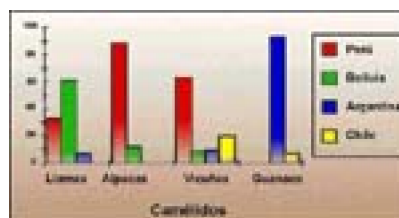


Gráfico N° 3. Distribución aproximada de la población de camélidos sudamericanos en países andinos en el 2001

Fuente: CONOPA

3.1.3 RAZAS Y FIBRA DE ALPACAS

Una raza es un conjunto de animales que tienen un origen común y características que los distinguen como un grupo reproductivo y un tipo sería una variación en apariencia o conformación entre animales²⁹. La denominación de tipo es aparentemente amplia y puede ser empleada para agrupar razas por una característica común, o definir formas diferentes en conformación, por ejemplo carne, leche, lisos y crespos. El término variedad es también un poco ambiguo, pudiendo incluir variaciones fenotípicas no genéticas³³. Sin embargo, a diferencia del significado tan amplio de tipo, variedad puede interpretarse como un subconjunto de individuos dentro de una especie o raza, que responde a un genotipo definido y presenta estabilidad fenotípica. Considerando esta última definición, una variedad puede por selección y apareamiento interconvertirse en una raza, y un tipo puede convertirse en una variedad cuando la mayor parte de su expresión diferencial se debe a factores genéticos transmisibles de generación en generación.

Existen dos razas reconocidas, la Suri y la Huacaya⁹. La alpaca, sea Huacayo o Suri, presenta fibra de color por pigmentación natural; los colores son: a) sólidos básicos: blanco, negro y castaño, este último en tonos que van desde crema, conocido en el comercio como LF ("light fawn"), hasta café oscuro; b) mezclados o matizados: gris, en tonos de claro a oscuro, según la proporción de los componentes blanco y negro; rosillo, también en tonalidades según proporción de blanco y castaño o el grado de oscuridad de este último (Gráfico N° 4).



Gráfico N° 4A. Razas de alpacas (Raza Huacaya)



Gráfico N° 4B. Razas de alpacas (Raza Suri)

En virtud de que la fibra blanca es la más preciada, seguida de los colores claros, los productores de alpaca tienden a incrementar la proporción de los mismos. Aproximadamente el 30% del ganado alpacuno es blanco, mientras que en la llama el color blanco puro no excede el 10%. Como disponibilidad comercial puede observarse algo más que esas proporciones, porque los campesinos suelen retener para usos domésticos los vellones oscuros y negros, por su menor precio de venta.

La alpaca de un año de edad tiene fibra de 7 a 10 cm de longitud, suficiente para todo proceso textil moderno. La fibra suele ser extralarga, cuando la esquila es cada dos o más años, criterio que caracterizaba a la textilería del pasado.

La composición de aminoácidos de la queratina de la fibra de alpaca fue estudiada por Villarroel⁵² quien eligió muestras de fibra blanca Huacaya y Suri típicas, analizó la composición de aminoácidos por métodos cromatográficos, encontrando un mayor contenido de cisteína que la lana de ovinos, especialmente en Suri, lo que explicaría el alto contenido de Azufre elemental, de 4,19%.

El vellón de la alpaca Suri posee características notablemente diferentes al de la Huacaya; sus fibras son de gran longitud, onduladas que caen a ambos lados del cuerpo y de naturaleza dominante, es ligeramente más fino, pesado, brillante y suave, y de apariencia similar al de ovinos de la raza Lincoln⁴⁸. En la Huacaya, el vellón está conformado de fibras de menor tamaño, rizadas, que le confieren una apariencia esponjosa¹³. En la alpaca Huacaya, las mechass se mantienen perpendiculares al cuerpo, observándose entrelazamiento en las fibras, facilitado por los rizos; sin embargo, en Suri, las mechass caen paralelas al cuerpo, dejando expuesta la línea superior. La fibra

Huacaya es menos uniforme, pero se puede teñir fácilmente⁹. Se especula además, diferencias en términos de menor adaptación a medios extremos: más susceptible a la altitud y a los cambios bruscos de temperatura lo que explicaría el bajo número de Suris con respecto a la población total de alpacas en los andes peruanos^{9,41}. Sin embargo no hay evidencias objetivas ni estudios realizados que expliquen este fenómeno.

En el Perú se produce cerca de 3000 ton/año de fibra bruta de alpaca. En Bolivia la producción es de 250 ton/año. La producción de fibra de llama oscila entre 500 y 600 ton/año. La producción de alpaca en el Perú llegó a 3900 ton/año, como el mayor volumen histórico en 1969, para decaer a partir de la reforma agraria a 2500 ton/año de fibra bruta en el 2002, este volumen es imperceptible frente al consumo de lana en el mundo, de alrededor de 1400000 ton/año.

3.1.4 HIBRIDACIÓN

Las cuatro especies de camélidos sudamericanos tienen el mismo cariotipo ($2n=74$) y pueden cruzarse entre ellas produciendo crías fértiles¹⁶. La mayoría de estos cruces son raros, forzados por el hombre, y no ocurren en la naturaleza. La existencia de híbridos fértiles productos de los cruces guanaco con vicuña, guanaco con alpaca, y vicuña con llama, indican una separación reciente de los dos géneros y refuerzan las evidencias paleontológicas de que esto ocurrió hace sólo 2 millones de años. Se ha descrito un grupo de híbridos guanaco con llama que vivían en estado silvestre en la provincia de Córdoba, Argentina. Estos animales eran producto del libre cruzamiento en el campo y generalmente tenían el fenotipo del guanaco, aunque existían algunas con manchas de color blanco en la cabeza y parte superior del cuello y otros de color casi blanco³². El comportamiento de estos híbridos era igual al guanaco, sobrevivieron y se reprodujeron sin problema. MacDonagh³² no comenta si hubo cambios en tamaño corporal o calidad de la fibra de este cruce. Sin embargo observa, en el sentido de que los "Harneros" del Alto Perú prefieren híbridos guanaco con llama como animales de carga. Es muy probable que estos animales tengan más resistencia y fuerza que la llama, debido al vigor híbrido que acompaña el cruce de cualquier animal doméstico con su pro- genitor silvestre.

El cruce de la alpaca y vicuña es un cruce entre un animal doméstico con su progenitor silvestre. No representa ni la domesticación de la vicuña, ni el mejoramiento genético de la alpaca, pues produce un animal con características de vigor híbrido, con mejora en la finura de fibra relativa a la alpaca durante una sola generación. Los híbridos de la primera generación tienen fibra semejante a la vicuña, pero esta característica se pierde en las siguientes generaciones. El cruce más común entre los camélidos sudamericanos es entre la llama y la alpaca. Este híbrido, conocido como wari, está subdividido por los pastores tradicionales entre llama wari (semejante a llama) y paqowari (semejante a alpaca)¹⁵. Los wari's reúnen características fenotípicas no deseables, intermedias entre la llama y la alpaca; son de menor tamaño que la llama y por tanto, no son animales que estén adaptados para carga, producen fibra de menor calidad que las alpacas. Los antiguos peruanos evitaban estos híbridos y eliminaban los waris de sus rebaños para asegurar la pureza de las dos especies y sus probables razas³⁸. Sin

embargo, este sistema de crianza se perdió durante el caos y la destrucción que acompañó a la invasión española. En estas circunstancias es muy probable que se produjeran hibridaciones entre el reducido número de animales que sobrevivieron con efectos fenotípicos aún desconocidos.

3.1.5 CITOGENÉTICA Y POLIMORFISMOS

El estudio de polimorfismos sobre la base de proteínas sanguíneas, la fragmentación del ADN por medio de enzimas de restricción, la identificación de proteínas o fragmentos que puedan tener relación con alguna característica de importancia económica y la determinación precisa de la paternidad y el parentesco entre animales, son objetivos primordiales para ampliar el conocimiento de los camélidos andinos.

Villavicencio⁵⁴ utilizando la técnica de electroforesis en gel de almidón, reportaron hemoglobinas de movilidad lenta en alpacas. Las transferrinas en la alpaca son polimórficas, habiéndose identificado hasta 7 bandas, correspondiendo cada una de ellas a un alelo codominante, con predominancia de los fenotipos 2 y 3⁵⁴.

La alpaca, al igual que los demás camélidos sudamericanos, posee un cariotipo de 74 cromosomas: 36 pares de autosomas y un par sexual, con un contenido aproximado de 6,76 picogramos de ADN nuclear⁶. Según Bunch⁸, los cariotipos de guanaco y llama son iguales, presentando un patrón de bandas G y C idéntico, encontrándose 5 Regiones Organizadoras del Nucleolo (RONs) en el primero y 6 sobre cromosomas acrocéntricos pequeños en los restantes, similar patrón de bandas fue confirmado por Bianchi⁶ en llamas y alpacas.

Resultados de desnaturalización y centrifugación de ADN de camélidos sudamericanos indican la presencia de un componente de ADN similar y por lo menos 5 fracciones satélites, con contenido variable de bases G + C de 32 a 66%. La temperatura de desnaturalización del ADN varía de 70° a 70,3°C, observándose por centrifugación una banda principal y cinco picos de ADN, cuatro de los cuales aparecen en el lado pesado y el restante en el liviano. El análisis de hibridaciones *in situ* ratificó lo encontrado en los exámenes antes indicados⁵⁰.

La localización y frecuencia de los RONS y los sitios de hibridación de ADN en las cuatro especies de camélidos sudamericanos, ocurren distalmente en las constricciones secundarias y satélites de los cromosomas 18, 21 y 27, no observándose diferencias claras en el tamaño de los RONS entre animales. Todas las especies mostraron variación en la frecuencia de RONS por célula, promedio de 6 en la llama, guanaco y alpaca, y 4 en la vicuña. La distribución fue similar en todas las especies, a excepción de la vicuña. Las hibridaciones coincidieron con las regiones Ag-RON en llamas y vicuñas⁵¹.

Últimamente se han estudiado los perfiles con enzimas de restricción, de los genes ribosómicos y de fracciones de ADN satélite altamente repetidos, obteniéndose árboles filogenéticos por parsimonia, que confirman la separación de la vicuña del resto de los camélidos andinos y el agrupamiento monofilogenético de la llama y el guanaco⁵⁰.

3.2 ASPECTOS GENERALES DE LAS TÉCNICAS BIOMOLECULARES

3.2.1 Reacción en cadena de la polimerasa

3.2.1.1 Bases moleculares de la PCR

Desde su introducción, la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) ha transformado totalmente los métodos de aislamiento y amplificación del ADN, tanto en laboratorios de investigación básica como aplicada. La técnica fue desarrollada por Kary B. Mullis, y descrita por primera vez en 1985 una manera más simple de sintetizar grandes cantidades de ADN *in vitro* basándose en el procedimiento que la célula emplea *in vivo*³⁷. El descubrimiento le valió el premio Nóbel en 1993. La PCR es un método enzimático que utiliza dos oligonucleótidos sintéticos complementarios de los extremos 3' del molde y con sus terminales 3'OH enfrentados como cebadores y que sintetiza numerosas copias del fragmento de ADN comprendido entre ambos oligos. La sucesión de una serie de ciclos en los que tiene lugar la desnaturalización del molde, hibridación con los cebadores y extensión de la síntesis por acción de la ADN polimerasa, origina una acumulación exponencial de fragmentos específicos cuyos extremos estarán definidos por los extremos 5' de los cebadores. Al poder ser utilizados los productos de un ciclo como moldes del ciclo siguiente, el número de copias de ADN, se dobla en cada ciclo. Así pues, 30 ciclos de PCR producen una amplificación de un millón de copias aproximadamente¹⁸.

Las ADN polimerasas que se emplean son termorresistentes, la más usada es procedente de *Thermus aquaticus* (*Taq*), pero carece de actividad correctora de errores (exonucleasa 3'-5'), por lo que puede introducir aproximadamente un nucleótido equivocado por cada 1000, este índice de error no suele presentar problemas en la mayoría de aplicaciones, pero ha de tenerse en cuenta, y la magnitud puede ser importante si ocurre en los primeros ciclos. Otras polimerasas, como la obtenida de *Pyrococcus furiosus* o la aislada de *Thermococcus litoralis*, incorporan errores con una frecuencia mucho³⁹ más baja y pueden copiar fragmentos de mayor longitud que la *Taq* ADN polimerasa.

Para que la especificidad sea máxima, se debe evitar que la polimerasa y el resto de los componentes estén a temperatura ambiente antes de iniciar el primer ciclo. La polimerasa puede también añadirse una vez que se ha producido la primera desnaturalización del ADN o incluso mejor, para no tener que manipular los tubos una vez iniciado el proceso, la amplificación de secuencias por calor requieren cambios rápidos de temperatura, el proceso se realiza en un termociclador que lleva un microprocesador para programar estos cambios y el número de ciclos deseados²¹.

Deoxinucleosidos Trifosfatos o llamados dNTPs de alta pureza son proporcionados por varios fabricantes como cuatro soluciones stocks individuales o como una mezcla de los cuatro dNTPs. Muchas soluciones stocks son ahora proporcionadas en soluciones ajustadas a pH 7.5 con NaOH. La PCR normalmente se realiza con concentraciones de dNTP alrededor de 100 μM , aunque a menores concentraciones del dNTP (10-100 μM) la Taq ADN-polimerasa tiene una fidelidad más alta. Sin embargo, la concentración óptima de dNTPs depende de:

- La concentración de MgCl_2
- La estrechez de la reacción
- La concentración del cebador
- La longitud del producto amplificado
- El número de ciclos de PCR.

Para la optimización de un PCR particular puede ser necesario determinar empíricamente la mejor concentración del dNTP. Algunos nucleótidos modificados se han incorporado en productos de PCR por el uso de análogos de dNTP.

Buffers y MgCl_2 Hay varios buffers disponible para PCR. El buffer más común usado es de la Taq ADN- polimerasa el cual tiene los siguientes componentes en un buffer concentrado 10x y debe diluirse 1:10 (v/v) antes de usar:

- Tris-HCl, 100 mM, pH 8.3 a temperatura ambiente
- KCl 500 mM
- MgCl_2 15 mM
- Gelatina 0.1% (w/v).

Las composiciones de los buffers para el uso con otras polimerasas termostables pueden diferir; sin embargo, la mayoría de los proveedores normalmente proporcionan un buffer 10x para el uso con la enzima respectiva.

La concentración de MgCl_2 en la mezcla final de la reacción puede ser variada, normalmente dentro del rango 0.5-5.0 mM para encontrar el óptimo. Los iones Mg^{+2} forman un complejo soluble con dNTPs que es esencial para la incorporación de dNTP; ellos también estimulan la actividad de la polimerasa e incrementan la temperatura del ADN de doble cadena y la interacción del cebador con dicha cadena. La concentración de MgCl_2 puede tener un dramático efecto en la especificidad y rendimiento en una PCR. Las concentraciones de MgCl_2 1.0-1.5 mM son normalmente óptimos, pero en algunos casos, el exceso de Mg^{+2} producirá la acumulación de productos no específicos.

Inhibidores y potenciadores de PCR, muchos factores pueden llevar a la inhibición de la PCR, pero los mas importantes son la naturaleza de las especies biológicas, el método y reactivos usados para extraer el ADN. Diferentes muestras biológicas son usados para PCR, como por ejemplo tejidos animales y vegetales, fluidos corporales, muestras bacterianas, forenses, material arqueológico. El ADN humano se obtiene típicamente de células de sangre periférica, orina, heces, manchas celulares, raíces de

pelo, semen, fluido cerebroespinal, biopsia, liquido amniótico, placenta, y vello del corion. Además de estas fuentes, ADN de mamíferos y aves pueden extraerse de las secciones de la cola y raíces de la pluma respectivamente. Muchas de estas muestras contienen sustancias inhibitorias que no han sido identificadas y se deben realizar controles de PCR para asegurar que esa inhibición no está ocurriendo. Algunos potenciadores de la PCR podemos verlos en la tabla N° 2.

Tabla N° 2 Potenciadores de PCR

Sustancia	Concentración
Formamida	5%
Dimetil sulfoxido	<10%
Tetrametilamonio	10-100 µM
Polietilenglicol 6000 (PEG)	5 – 15%
Glycerol	10-15%
Tween 20	0,1 – 2,5%

Muchos investigadores han reportado sustancias que pueden agregarse a la PCR para aumentar la eficiencia o especificidad. Sin embargo, el modo de acción no ha sido determinada, aunque se han propuesto muchas posibles explicaciones. La mayor desventaja de todas estas sustancias es que no se puede emplear en cualquier PCR particular con la garantía de éxito. Muchas sustancias reforzaran a la PCR a una concentración específica pero el traslado de éstas condiciones a un PCR diferente pueden o no producir un efecto.

Una de las fuentes más comunes de material para la extracción de ADN es la sangre, y es mejor prevenir la coagulación en los tubos utilizando EDTA (1 mg/ml). Heparina, otro anticoagulante, no debería ser utilizado como tal en la recolección de sangre, ya que heparina es un potente inhibidor de la PCR. Otras sustancias en sangre, probablemente compuestos de porfirina, también son inhibidores potentes de la PCR y éstos pueden ser eliminados de la preparación del ADN por lisis de las células de la sangre y centrifugación hasta sedimentar las células blancas.

Los métodos de extracción de ADN son numerosos, la elección de uno depende del espécimen biológico. El desacierto del método puede causar dificultades al llevar diferentes agentes inhibitorios del procedimiento de extracción a la reacción de PCR. La extracción de ADN de diferentes fuentes rutinariamente utiliza detergentes para la lisis celular y desnaturalización.

A menudo, detergentes no iónicos (por ejemplo Tritón X100, Tween 20 (Nonidet P40) son usados y generalmente no inhiben la PCR a concentraciones de 5%. Por otro lado, detergentes iónicos como el dodecil sulfato de sodio (SDS) solo pueden ser tolerados a concentraciones sumamente bajas, 0.01% (w/v), por consiguiente deberán ser retirados por extracción con fenol y precipitación del ADN con etanol antes de realizar la PCR. El efecto inhibitorio de bajas concentraciones de SDS puede invertirse por ciertos detergentes no iónicos por ejemplo Tween 20.

Se realizan muchos procedimientos de extracción con detergentes en presencia de

proteínasa K, una proteasa que digiere las proteínas desnaturalizadas. *Taq* ADN-polimerasa es susceptible a la digestión por las proteasas y para que no obstaculice la reacción proteínasa K debe quitarse o inactivarse, la desnaturalización térmica a 95 °C es suficiente para lograrlo. El tratamiento por calor normalmente es seguido por extracción con fenol que también desnaturaliza la proteínasa K. La centrifugación subsecuente dividirá la proteasa a la fase fenol/orgánica dejando el ADN en la fase acuosa. Los residuos de fenol, que también puede inhibir PCR, puede ser entonces quitado por el cloroformo: alcohol isoamílico (49:1) o extracción con éter, o alternativamente por la precipitación del ADN con etanol.

3.2.1.2 Técnicas basadas en PCR

Polimorfismo de los fragmentos de restricción

Los "Polimorfismos en Longitud de los Fragmentos de Restricción" (RFLPs *Restriction Fragment Length Polimorphisms*) representan la primera metodología de genotipaje basada en el ADN. El primer ejemplo de RFLP fue descrito en 1976 para los loci de la globina humana β y γ . Esta técnica fue posible gracias al uso de herramientas auxiliares de biología molecular previamente descritas. Así, en 1970 se había identificado la primera enzima de restricción específica, que podía cortar largas cadenas de ácidos nucleicos en fragmentos discretos menores. También se demostró que la electroforesis en gel de agarosa o poliacrilamida podía usarse para separar dichos fragmento por tamaño. Todo ello era complementado con la transferencia de ácidos nucleicos a membranas y su posterior detección. Básicamente un RFLP consiste en fragmentar específicamente el ADN genómico, separar los fragmentos, transferirlos a un soporte rígido e identificar el tamaño de alguna secuencia específica²².

En primer lugar se aísla el ADN genómico del material biológico a estudiar. Es importante que dicho ADN tenga un elevado grado de pureza y, particularmente, esté libre de polisacáridos y otros inhibidores de las enzimas de restricción. El paso siguiente es precisamente la digestión de dicho ADN mediante enzimas de restricción. Los fragmentos discretos generados se someten a electroforesis en gel de agarosa para de esta forma separarlos por tamaños.

Las características resaltantes de esta técnica son: no requiere conocimiento previo de la secuencia, es una huella del ADN ("*fingerprinting*"), es laborioso y costoso, brinda información parcial de la información y presenta una genética de segregación codominante²².

Microsatélites

Los "Microsatélites" son secuencias repetidas cortas, generalmente son di, tri y tetranucleótidos repetidos en tandem en promedio de 3 a 50 veces se usa con fines de identificación y mapeo. Por ejemplo, los del tipo $(CA)_n$, $(GT)_n$ son precisamente la variabilidad en el número "n" de repeticiones lo que crea el polimorfismo. De tal modo que, disponiendo de una batería de unos pocos microsatélites que presenten suficiente grado de polimorfismo en la población, pueden realizarse identificaciones genéticas con una resolución muy elevada. Representan una continuación de las técnicas pioneras de *fingerprinting* multilocus que utiliza la PCR. Por lo tanto su fundamento es amplificar estos

loci mediante PCR con cebadores flanqueantes a la repetición. Esto genera fragmentos cuyo tamaño depende del número de repeticiones estos diversos tamaños caracterizan alelos de cada locus. Las aplicaciones resaltantes son la determinación de paternidad y parentesco, análisis de flujo génico a escala local, asignación de poblaciones de procedencia, etc. La técnica de "*fingerpriting*" por microsatélites tiene las siguientes características, requiere conocimiento previo de la secuencia (regiones adyacentes al microsatélite propiamente dicho), es un "*fingerprinting*" del ADN, relativamente de bajo costo, genera una cantidad alta de información, presenta una genética de segregación codominante, se usa frecuentemente por su simplicidad técnica, resolución y herencia codominante²².

3.2.1.3 Ventajas y desventajas de la PCR

Ventajas

- Rapidez. Se puede obtener resultados de muchas muestras en el mismo día.
- Sensibilidad. Una sola molécula de ADN puede amplificarse, a menudo por PCR, a niveles detectables, PCR es una herramienta de diagnóstico extremadamente sensible, para detectar fracciones de ADN de todo tipo de organismos.
- Especificidad. Debido a que el ADN constituye el material genético único de cada organismo.
- Versatilidad. El mismo procedimiento experimental es dirigido, esencialmente, con el mismo equipo, materiales, reactivos químicos y biológicos para amplificar cualquier ADN de interés.
- Bajo costo. Aunque la PCR pueda parecer a menudo como una técnica cara, sofisticada, es realmente bastante simple y puede realizarse usando una metodología económica mediante la implementación de la tecnología apropiada, técnicas alternativas, simplificación de procedimientos experimentales.
- Información Genética. Uno de los aspectos mas útiles de PCR es que puede proveer información importante sobre el organismo en estudio. Debido a la especificidad de los cebadores, por ejemplo, puede determinarse el género, árbol filogenético, o nivel de especie. Métodos simples de genotipaje permiten la identificación de cadenas individuales para estudios de epidemiología molecular, información sobre toxicidad o resistencia a fármacos¹⁸.
- Accesibilidad de la muestra. Además de las muestras clínicas, pueden analizarse especímenes de una variedad de fuentes usando las mismas técnicas moleculares.
- Estandarización de resultados. Desde que los resultados de PCR son registrados como la presencia o ausencia de fragmentos de ADN de un tamaño particular, existe variabilidad mínima en la interpretación de resultados entre los investigadores.
- No requiere esterilidad microbiológica. El principal problema con las técnicas de diagnóstico y caracterización de cepas que necesitan el cultivo de un organismo es la necesidad de mantener esterilidad microbiológica. Esto puede ser muy difícil en laboratorios sin acceso a condiciones apropiadas de esterilidad en climas

contaminados o tropicales. Desde que PCR requiere solo pequeñas cantidades de ADN y no organismos, obvia la necesidad de la esterilidad microbiológica.

- Seguridad. El primer paso en la preparación de la fuente de ADN es lisar las células. Esto contrasta con muchos procedimientos de diagnóstico clásicos, que involucra el crecimiento de gran cantidad de patógenos para establecer su identidad.
- Rápida transferencia de tecnología: Desde que el procedimiento es esencialmente el mismo, no interesa que ADN sea amplificado, el entrenamiento inicial para utilizar PCR es relativamente rápido.
- Detección de organismos viables y no viables. Esta ventaja de la PCR se debe a que los organismos vivos no son necesarios para la detección exitosa. Sin embargo, en situaciones donde se requiere detectar solo organismos vivos se usa RT-PCR^{18,21}.

Desventajas:

- Riesgo de contaminación cruzada: A pesar de la extremada sensibilidad de PCR, la cual es una de las ventajas principales, existe riesgo de resultados falso-positivos. En teoría, una sola molécula del producto previa a una amplificación puede contaminar muestras negativas en una amplificación subsecuente.
- Inestabilidad del reactivo y alto costo: El problema clave para obtener y guardar los reactivos de PCR son su labilidad. Este problema empeora en climas tropicales, donde las temperaturas ambientales son altas. Oligonucleótidos (cebadores) y el ADN son realmente estables a temperatura ambiente cuando es seco y pueden enviarse fácilmente sin daño. Desde que la enzima crítica es una polimerasa termoestable, es más resistente que la mayoría de otras enzimas que son mucho más sensibles al calor. De todas maneras el tiempo de vida media de la *Taq* ADN polimerasa es prolongada si se mantiene en frío. El problema principal son las enzimas transcriptasa reversa, las cuales son necesarias para convertir ARN a ADN para amplificación subsecuente estas enzimas son notablemente frágiles y son difíciles de transportar de manera segura y conveniente. Sin embargo, una transcriptasa reversa termoestable aislada de *Thermus thermophilus* esta ahora disponible, que es por naturaleza más resistente.
- Infraestructura y equipo: PCR es muy útil para muchas aplicaciones, pero en nuestro país no es una técnica ideal para muchos análisis de rutina para un gran número de muestras. Utilizando el procedimiento convencional en tubos individuales, 50-60 muestras es aproximadamente el límite superior por amplificación corrido por una sola persona.
- No conveniente para pruebas clínicas primarias. La PCR puede ser tremendamente simplificado para el uso bajo circunstancias difíciles, pero no es un método de diagnóstico rápido o simple. La técnica requiere un laboratorio adecuadamente equipado provisto con personal especializado. Es más apropiado para un laboratorio central en un hospital, universidad o centro de referencia.
- Reproducibilidad. Existen muchas formas por las cuales una amplificación por PCR puede salir mal, y muchos factores pueden alterar la reproducibilidad. Estos incluyen: baja calidad de la muestra, presencia de inhibidores o nucleasas, mucha variabilidad

de reactivos, pobre calidad del agua, problemas no anticipados, pérdida de la actividad de la enzima y problemas técnicos^{18,21}.

3.2.2 ADN polimorfo amplificados al azar (RAPD)

El "ADN Polimórfico Amplificado al Azar" (RAPD; *Random Amplified Polymorphic DNA*) representa el primer ejemplo de una serie de nuevas y poderosas metodologías de tipaje de ácidos nucleicos basadas en la técnica PCR. También ha sido denominado "PCR Cebado al Azar" (AP-PCR; *Arbitrary Primed PCR*). Fue descrita de forma independiente y simultánea en 1990⁵⁷, una modificación posterior que emplea oligos arbitrarios muy pequeños ha sido denominada "*Fingerprinting de Amplificación del ADN*" (DAF; *DNA Amplification Fingerprinting*). Sin embargo, el RAPD constituye una variante de la PCR, ello es así porque la PCR clásica (descrita anteriormente), requiere el conocimiento de las secuencias que flanquean el ADN a amplificar, para el diseño de los correspondientes cebadores. Sin embargo, en muchos casos no se dispone de dicha información. En tales circunstancias, es todavía posible realizar una amplificación "al azar", siempre que se utilicen cebadores pequeños (generalmente, de 10 pares de bases) y a temperaturas de hibridación muy permisivas (entre 35-42 °C). El ADN genómico purificado es sometido a una PCR especial relajada, con hibridación a baja temperatura y cebadores muy cortos. Es importante que el ADN esté libre de compuestos polifenólicos (taninos y otros), que podrían oxidar al ADN (con ayuda del aire y luz). Los cebadores se unen a distintas secuencias diana y comienzan a generarse amplicones de diferentes tamaños. Esto es muy importante, porque va a condicionar el hecho de que los RAPD presenten generalmente un patrón de segregación genética dominante; es decir, que no permitan diferenciar al heterocigoto de uno de los homocigotos. La razón de dicha segregación de tipo dominante es la posible mayor longitud de un amplicón en relación al competidor, sobre todo, la diferente afinidad de cada oligo por sus dianas. Ello producirá diferentes reacciones en desigualdad de condiciones, entre los diferentes productos amplificados. Debe recordarse que la hibridación del oligo con la diana no suele ser perfecta; después de todo, son oligos inespecíficos. De modo que, como la PCR sigue la "ley del todo o nada", no todos los posibles amplicones serán reamplificados con la misma eficiencia. Tendrán preferencia los más cortos. Y, sobre todo (dentro de un rango de tamaños no muy grande), aquellos en que los cebadores delimitantes tengan mayor afinidad por su diana^{21,62}.

Los productos generados tras la amplificación permisiva son separados mediante electroforesis en gel de agarosa. Posteriormente son visualizados mediante fluorescencia de luz UV de onda corta (254 nm), tras tinción con bromuro de etidio (EtBr). Para obtener mayores resoluciones, puede emplearse una matriz de poliacrilamida y tinción con plata. Las bandas generadas mediante RAPD, pueden clonarse y secuenciarse, permitiendo así su posterior amplificación mediante cebadores de mayores números de nucleótidos más específicos. Son las llamadas "Regiones Amplificadas de Secuencia Conocida" (SCARs; *Sequence-Characterized Amplified Regions*) o "Sitios con Secuencia Marcada" (STSs; *Sequence-Tagged Sites*). A su vez, éstos pueden ser útiles para los llamados "Polimorfismos Amplificados, Específicos de alelos" (ASAPs; del inglés, *Allele-Specific*

Amplified Polymorphisms"). El problema es que normalmente suele perderse el polimorfismo original de los RAPDs cuando se re-amplifican de forma específica (empleando sus secuencias externas como cebadores). Otra prueba a favor de que el polimorfismo observado en los RAPDs deriva simplemente de las diferentes afinidades cebador-diana; En otras palabras, de las uniones imperfectas o desapareamientos entre los oligos al azar y sus múltiples dianas posibles. Dadas la condiciones tan relajadas de reacción, los RAPDs pueden presentar el inconveniente de una baja consistencia (repetitividad). Sin embargo, empleando una metodología controlada y constante (ciclador térmico, tipo y concentración de reactivos, etc), pueden conseguirse resultados muy satisfactorios. Las principales características de los RAPDs pueden resumirse en:

No requiere conocimiento previo de la secuencia, es un "*fingerprinting*" del ADN, tiene requerimientos relativamente de bajo costo, genera una alta cantidad de información, y presenta generalmente una genética de segregación dominante^{21,57}.

3.2.3 Ejemplos del uso del RAPD

Zavaleta en 1997⁶³ estudió la diversidad genética intraespecífica en 37 cepas de *Oenococcus oeni* aisladas de vino mediante RAPD, ribotipificación, contenido de pequeños plásmidos y secuenciación de marcadores RAPD con amplia distribución entre las cepas. El perfil de RAPD separó a las cepas en 2 grandes grupos coincidentes con trabajos previos obtenidos por tipificación con macrorestricción. La ribotipificación y la conservación de marcadores RAPD indican que *Oenococcus oeni* es una especie relativamente homogénea. Además secuencias idénticas de ADN de algunos marcadores RAPD entre cepas representativas de cada "cluster" de RAPD indican que *Oenococcus oeni* es un grupo filogenéticamente pequeño, probablemente corresponde a un sólo clon o a una línea descendientes de clones, especializados para crecer en un ambiente selectivo como es el vino⁶³.

La técnica del ADN Polimórfico Amplificado al Azar (RAPD) fue utilizado con mucho éxito para examinar la similitud entre varias comunidades microbianas de ambientes acuáticos. Después de la amplificación del ADN total, los productos de PCR fueron observados por electroforesis en gel de agarosa y los patrones de bandas se compararon para determinar el porcentaje de similitud. 12 cebadores diferentes se utilizaron para amplificar aproximadamente 100 fragmentos de cada muestra de ADN; las bandas se registraron como presente o ausente y la similitud entre cada muestra fue determinada utilizando el coeficiente de Jaccard. De esta información se construyeron dendrogramas y un procedimiento de "bootstrapping" fue utilizado para evaluar la consistencia del árbol filogenético. Los resultados obtenidos de dos sistemas experimentales diferentes (en aguas de riachuelo y varios pozos de un acuífero de agua subterránea poco profunda) confirmaron que la técnica del RAPD es útil para diferenciar entre las comunidades microbianas y estimar sus relaciones filogenéticas^{42,40,19}.

48 cepas de *Listeria monocytogenes* fueron genotipadas por métodos rápidos: ADN polimórfico amplificado al azar (RAPD) y el polimorfismo en tamaño de los espacios intergenicos de los genes ribosómicos 16S-23S (ITS); los resultados se compararon con los obtenidos por la electroforesis en gel por campo pulsado (PFGE). Las cepas

provenían de cerdos, productos de la carne o de ambientes donde se procesan estos productos. La tipificación por RAPD empleo dos cebadores de PCR diferentes y agrupó a las cepas en 10 genotipos. La tipificación por ITS empleando los cebadores diseñados para las secuencias conservadas de los genes ribosómicos 16S y 23S de eubacterias mostró solo 2 genotipos. La tipificación con electroforesis en gel por campo pulsado tuvo un índice de discriminación de 0.910 obteniéndose 15 genotipos. La combinación de RAPD e ITS dio un índice de discriminación de 0.844¹⁷. Se observó que PFGE es mas sensible que los otros dos métodos, sin embargo, requiere de equipos sofisticados, es muy laborioso y consume mucho tiempo. Esto demuestra no solamente la eficiencia del RAPD si no también su eficacia al trabajar con otros métodos, en este caso, con ITS²⁶.

La técnica de ADN polimórfico amplificado al azar (RAPD) ha demostrado detectar daños inducidos por genotoxicidad y mutaciones¹¹. Los cambios que ocurren en los perfiles de RAPD luego de tratamientos con genotóxicos incluyen variación en la intensidad de la banda, así como, ganancia o pérdida de bandas. Sin embargo, la interpretación de los eventos moleculares responsable de las diferencias en los patrones de RAPD no es fácil, desde que diferentes alteraciones de ADN pueden pasar desapercibidos. ADN genómico de diferentes especies se digirió con enzimas de restricción y/o ultrasonizadas, y tratado con benzo-a-pireno diol epoxido (BPDE) y los perfiles de RAPD resultantes fueron evaluados. Los perfiles de RAPD derivados de ADN genómico cortados con enzimas de restricción, varían dependiendo de la frecuencia de corte de dicha enzima, así las enzimas que cortan el ADN genómico con mayor frecuencia producen cambios en los perfiles de RAPD que las de menor frecuencia. La ultrasonización causo grandes cambios en los perfiles de RAPD e indujo una mayor frecuencia de rompimiento del ADN, las bandas de mayor peso molecular inicialmente desaparecieron, por que el rompimiento mecánico ocurre con mayor frecuencia en los fragmentos más grandes. Los principales cambios observados en los perfiles de RAPD en muestras tratadas con BPDE causó cambios muy similares, pero amplicones de peso molecular alto disminuyeron su intensidad, la desaparición de bandas de peso molecular alto se debió probablemente a la producción de productos voluminosos los cuales bloquean o reducen la actividad de la *Taq* polimerasa³. Todo esto sugiere que existen interacciones no aleatorias entre intermediarios diolepoxidos y ADN. En conclusión este estudio indica que bajo ciertas condiciones el ensayo RAPD puede ser usado en la detección de daños o mutaciones en el ADN^{24,4}.

Se ha descrito la variabilidad en razas caninas autóctonas de España estudiadas con marcadores RAPD previamente descritos para la detección de polimorfismos en razas caninas Galgo español, podenco, perro de agua y alanos, utilizando como tamaño de muestra 16 animales, mostrando diferencias en el número y tamaño de las bandas amplificadas. Las mayores diferencias se obtuvieron en la raza alanos que mostró 4 bandas (400 y 500 pb) y una de 400 pb en galgos y podencos^{43,36}.

El RAPD ha sido considerado una de las técnicas para la evaluación de la diversidad genética y su uso en los programas de conservación²⁸. Los marcadores genéticos dan una estimación de la diversidad genética neutral. Existen técnicas, que ofrecen información diferente según las características de la molécula o fragmento analizado, lo mas común es detectar diferencias de tamaño; a partir de las frecuencias con que

aparecen cada una de las distintas variantes (alelos) se calculan diversos parámetros que nos dan la medida de la diversidad neutral y permiten comparar entre especies^{23,30}. A partir de estos datos también es posible establecer relaciones de parentesco filogenético, o analizar que procesos están ocurriendo en las poblaciones como migración, diversidad genética, supervivencia de especies, etc⁴⁹.

Se ha utilizado el RAPD como una técnica molecular para la conservación de recursos genéticos forestales, específicamente se ha usado para caracterizar clones en especies de los géneros *Populus* y *Salix*⁴⁴, de igual manera, se han determinado marcadores RAPD para la distinción de clones de diversas especies de *Populus* plantados en España, así como para identificar a diferentes árboles de *Populus trémula* procedentes de distintas localidades¹.

En el Brasil la especie sobreexplotada de *Caesalpinia echinata*, que se considera amenazada en la costa Atlántica, fue estudiada en pequeñas poblaciones naturales mediante RAPD permitiendo determinar claras correlaciones entre distancias genéticas y geográficas, identificando áreas de diversidad, necesarias para diseñar planes de conservación^{10,12}.

Los marcadores generados por RAPD pueden ser utilizados para la construcción de extremos físicos de locis de interés. Se desarrolló un análisis simple por RAPD de las genotecas basado en la identificación de un pool de cósmidos y amplificación de clones de RAPD de interés. Este método no requiere el clonado o la caracterización del marcador RAPD ya que este es liberado en el análisis de los pools de cósmidos o clones utilizando un simple protocolo de RAPD. Se aplicó esta estrategia utilizando cuatro marcadores de RAPD compuestos de simples copias o secuencias repetidas unidas a genes avirulentos del hongo *Magnaporthe grisea*. Los cósmidos conteniendo estos marcadores RAPD fueron fácil y rápidamente identificados permitiendo la construcción de extremos físicos de estos loci^{55,5}.

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Materiales

4.1.1 Material biológico

Como controles se utilizaron alpacas puras e híbridas determinados por técnicas de Microsatélites y ADN mitocondrial pertenecientes a la colección de la Coordinadora de Investigación y Desarrollo de Camélidos Sudamericanos (CONOPA), tal como se muestra en la tabla N° 3.

Tabla N° 3. Camélidos Sudamericanos controles utilizados en el estudio molecular de Lama pacos.

Control	Código	Origen	Características
Alpaca Pura	J27	Inglaterra	Prima Donna
Alpaca pura	J30	Chile	Carmina
Alpaca híbrida	1454	Perú	Alpaca hembra
Vicuña	V1278	Perú	Vicuña
Guanaco	GUA	Perú	Guanaco

El tamaño de muestra fue de 43 alpacas procedentes de la provincia de Cánchis en el departamento de Cuzco (25) y de la provincia de Antacalla del departamento de Puno (18) cuyo hábitat se encuentra entre los 2500 y 5000 msnm respectivamente. Las muestras fueron tomadas aleatoriamente de criadores diferentes con rebaños mayores a 200 animales adultos. Las características de los animales que forman parte de la muestra se presentan en la Tabla N° 4.

Tabla N° 4. Características de Alpacas utilizadas en la aplicación de la técnica del RAPD en el estudio molecular de Lama pacos.

Orden	Codigo	Raza	Edad	Fibra (micras)	Propiedad	Provincia
1	3001	Huacaya	BLL	21,7	Wichayaj	Cuzco
2	3004	Huacaya	BLL	16,4	Wichayaj	Cuzco
3	3007	Huacaya	BLL	25,0	Wichayaj	Cuzco
4	3009	Suri	BLL	28,4	Wichayaj	Cuzco
5	3011	Huacaya	2D	18,4	Wichayaj	Cuzco
6	3013	Huacaya	2D	20,2	Wichayaj	Cuzco
7	3014	Huacaya	2D	19,2	Wichayaj	Cuzco
8	3015	Huacaya	2D	21,5	Wichayaj	Cuzco
9	3016	Suri	4D	24,4	Wichayaj	Cuzco
10	3017	Suri	BLL	26,1	Wichayaj	Cuzco
11	3023	Huacaya	BLL	24,0	Toxacota	Cuzco
12	3051	Suri	BLL	22,8	Ppity	Cuzco
13	3053	Suri	2D	31,1	Ppity	Cuzco
14	3058	Huacaya	BLL	25,7	Ppity	Cuzco
15	3075	Huacaya	2D	19,5	Mamuera	Cuzco
16	3081	Huacaya	4D	21,1	Patacalasaya	Cuzco
17	3082	Huacaya	BLL	21,8	Patacalasaya	Cuzco
18	3084	Huacaya	BLL	23,4	Patacalasaya	Cuzco
19	3086	Huacaya	BLL	21,7	Patacalasaya	Cuzco
20	3091	Huacaya	BLL	21,1	Patacalasaya	Cuzco
21	3088	Huacaya	BLL	24,8	Patacalasaya	Cuzco
22	3092	Huacaya	4D	23,3	Patacalasaya	Cuzco
23	3094	Huacaya	2D	22,8	Patacalasaya	Cuzco
24	3100	Suri	2D	21,8	Patacalasaya	Cuzco
25	3501	Huacaya	4D	30,2	Silli	Cuzco
26	3502	Huacaya	2D	18,6	Julio Cuba Alvarado	Cerro de Pasco
27	3505	Huacaya	DL	17,9	Sallalli APX	Cerro de Pasco
28	3506	Huacaya	2D	17,7	R. Alianza	Cerro de Pasco
29	3508	Huacaya	2D	18,2	R. Alianza	Cerro de Pasco
30	3512	Huacaya	DL	14,4	Sallalli APX	Cerro de Pasco
31	3514	Huacaya	2D	21,6	R. Alianza	Cerro de Pasco
32	3516	Huacaya	2D	16,9	R. Alianza	Cerro de Pasco
33	3517	Huacaya	2D	21,7	R. Alianza	Cerro de Pasco
34	3518	Huacaya	2D	18,0	R. Alianza	Cerro de

Orden	Codigo	Raza	Edad	Fibra (micras)	Propiedad	Provincia
						Pasco
35	3521	Huacaya	2D	17,7	R. Alianza	Cerro de Pasco
36	3522	Huacaya	2D	17,2	R. Alianza	Cerro de Pasco
37	3523	Huacaya	2D	17,1	R. Alianza	Cerro de Pasco
38	3524	Huacaya	4D	17,9	Sallalli APX	Cerro de Pasco
39	3526	Huacaya	2D	19,0	R. Alianza	Cerro de Pasco
40	3527	Huacaya	2D	17,3	R. Alianza	Cerro de Pasco
41	3529	Huacaya	2D	18,3	Sallalli APX	Cerro de Pasco
42	3530	Huacaya	2D	16,6	R. Alianza	Cerro de Pasco
43	3541	Huacaya	DL	22,3	R. Alianza	Cerro de Pasco

4.1.2 Soluciones

Se utilizó buffer Tris - EDTA (TE) para la extracción de ácidos nucleicos, mientras que para la electroforesis en gel de agarosa se utilizaron las soluciones Gel loading buffer y los buffer de corrida Tris – acetato - EDTA (TAE) y Tris – borato – EDTA (TBE), estas dos últimas fueron preparadas como soluciones concentradas.

Buffer TE	
Tris	10 mM
EDTA	1 mM

Se ajustó el pH a 8,0 y se repartió en alícuotas de 10 mL.

Buffer de cargado o "Gel loading buffer"	
Glicerol esteril	5.0 mL
10X TAE buffer	1.0 mL
Azul de bromofenol al 10%	1.0 mL
Xileno cianol	1.0 mL
H ₂ O bidestilada	2.0 mL

Se repartió en alícuotas de 1 mL y se conservó a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Buffer de corrida TAE 50X	
Tris base	242 g
Ácido acético	57.1.mL
0,5 M EDTA (pH 8.0)	100 mL

Se ajustó a pH: 8,4; se adicionó agua bidestilada c.s.p. 1000 mL y se esterilizó en autoclave a $121\text{ }^{\circ}\text{C}$, 15 PSI por 15'. Se conservó a temperatura ambiente.

Buffer de corrida TBE 5X	
Tris base	54 g
Ácido bórico	27.5 g
0,5 M EDTA (pH 8.0)	20 mL

Se ajustó a pH: 8,4; se adicionó agua bidestilada c.s.p. 1000 mL y se esterilizó en autoclave a $121\text{ }^{\circ}\text{C}$, 15 PSI por 15'. Se conservó a temperatura ambiente.

Buffer de lisis QLB	
Tris	200mM
Cloruro de sodio	250 mM
SDS	0,5%
EDTA	25 mM

Se ajustó el pH a 8,5 y se repartió en alícuotas de 10 mL.

4.2 Métodos

4.2.1 Toma de muestra

De cada alpaca se obtuvo 2 ml de sangre de la vena yugular (como se muestra en el Gráfico N° 6) en tubos al vacío de 3 ml con anticoagulante (EDTA). Las muestras se conservaron a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 1 mes hasta concluir con el muestreo luego se llevaron al laboratorio para su uso y ser almacenados en congelación a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.



Gráfico N° 6. Extracción de sangre de alpaca, de cada alpaca se extrajo 2 ml de sangre de la vena yugular en tubos al vacío de 3ml con anticoagulante EDTA.

(cortesía CONOPA)

4.2.2 Extracción del ADN genómico

La sangre fue sometida a la extracción del ADN genómico mediante el método de extracción fenólica descrita por Boom en 1990⁷, con las siguientes modificaciones: En un tubo de microcentrifuga se mezcló 800 μ l de Buffer de lisis conteniendo proteinasa K (20 μ g/ml) con 100 μ l de sangre entera, se incubó a 57 °C por toda la noche. Posteriormente, el ADN se purificó añadiendo 800 μ l de fenol, se mezcló y centrifugó por 5 minutos a 12000 rpm. Se transfirió la fase acuosa a un tubo de microcentrifuga y se añadieron 600 μ l de cloroformo se homogenizó. La fase acuosa se trasvaso a otro tubo y se añadieron 60 μ l de acetato de sodio y 600 μ l de isopropanol, se incubó a -20°C por 90 minutos. Se centrifugó por 10 minutos a 12000 rpm, se descartó el sobrenadante y el precipitado se dejó secar a temperatura ambiente; finalmente se resuspendió en 50 a 100 μ l de buffer TE.

Una vez que el ADN fue extraído se analizó por electroforesis en gel de agarosa al 1% en buffer TAE 1X a 80 voltios durante una hora, luego fueron teñidos con bromuro de etidio y fotografiados. Para determinar la concentración de ADN extraído, se separaron concentraciones conocidas del marcador de peso molecular ADN del fago Lambda/Hind III, luego fueron visualizados en el transiluminador ultravioleta.

4.3 RAPD

4.3.1 Características de oligonucleotidos

Se utilizaron 23 cebadores diseñados por la compañía *Qiagen Technologies inc.* cuyas secuencias nucleotídicas y características son presentados en la tabla N° 6. Todos los cebadores son cortos presentan en su estructura 10 nucleótidos.

Tabla No 6. Características de los cebadores utilizados en la prueba del RAPD para l estudio molecular de Lama pacos³⁴.

Codigo	Secuencia (5'-3')	%(G + C) contenido	Tm
OPA-09	GGGTAACGCC	70	43,6
OPA-12	TCGGCGATAG	60	39,5
OPA-15	TTCCGAACCC	60	39,5
OPA-17	GACCGCTTGT	60	39,5
OPA-18	AGGTGACCGT	60	39,5
OPA-19	CAAACGTCCG	60	39,5
OPB-02	TGATCCCTGG	60	39,5
OPB-03	CATCCCCCTG	70	43,6
OPB-06	TGCTCTGCCC	70	43,6
OPB-07	GGTGACGCAG	70	43,6
OPB-11	GTAGACCCGT	60	39,5
OPB-12	CCTTGACGCA	60	39,5
OPB-13	TTCCCCCGCT	70	43,6
OPB-14	TCCGCTCTGG	70	43,6
OPB-19	ACCCCCGAAG	70	43,6
OPF-05	CCGAATTCCC	60	39,5
OPF-06	GGGAATTCCG	60	39,5
OPF-17	AACCCGGGAA	60	39,5
OPI-01	ACCTGGACAC	60	39,5
OPI-04	CCGCCTAGTC	70	43,6
OPI-10	ACAACGCGAG	60	39,5
OPI-11	ACATGCCGTG	60	39,5
OPI-14	TGAAGGCGGT	60	39,5
OPI-18	TGCCCAGCCT	70	43,6
OPI-19	AATGCGGGAG	60	39,5

4.3.2 Procedimiento de la técnica del RAPD

Aproximadamente 50 ng de ADN genómico fue amplificado en una mezcla de reacción conteniendo los siguientes componentes: Buffer PCR 1X, $MgCl_2$ 25 mM, dNTP 200 μ M (**Amresco**), de cada cebador 10 pmol, *Taq* ADN Polimerasa 1,5 U (**Bioline**) en un volumen final de 25 μ l.

La reacción se realizó en un termociclador Perkin Elmer 2500 utilizando las condiciones descritas por Welsh y MacLeland⁵⁷ con modificaciones en la temperatura de alineación o hibridación y los tiempos de cada reacción. El paso inicial fue de 1 ciclo a 95°C durante 4 minutos; luego 35 ciclos con las siguientes etapas: desnaturalización a 94 °C por 1 minuto, hibridación a 35 °C por 1 minuto, extensión 72 °C por 2 minutos; finalmente se realizó una extensión de 72 °C por 7 minutos.

Se separaron 5 μ l del producto amplificado por electroforesis en gel de agarosa al 1,2% en buffer TBE 0,5X a 60V. Para la comparación de los tamaños de los fragmentos amplificados se utilizó el marcador de peso molecular Ladder 100 pb (**Invitrogen**). Luego se tiñó en Bromuro de etidio y se fotografió utilizando un transiluminador de luz ultravioleta a 310 nm (Gráfico N° 7).

4.3.3 Análisis de resultados

El tamaño molecular de los fragmentos obtenidos por RAPD se analizaron y se compararon visualmente con patrones de alpacas descritas como genéticamente puras.

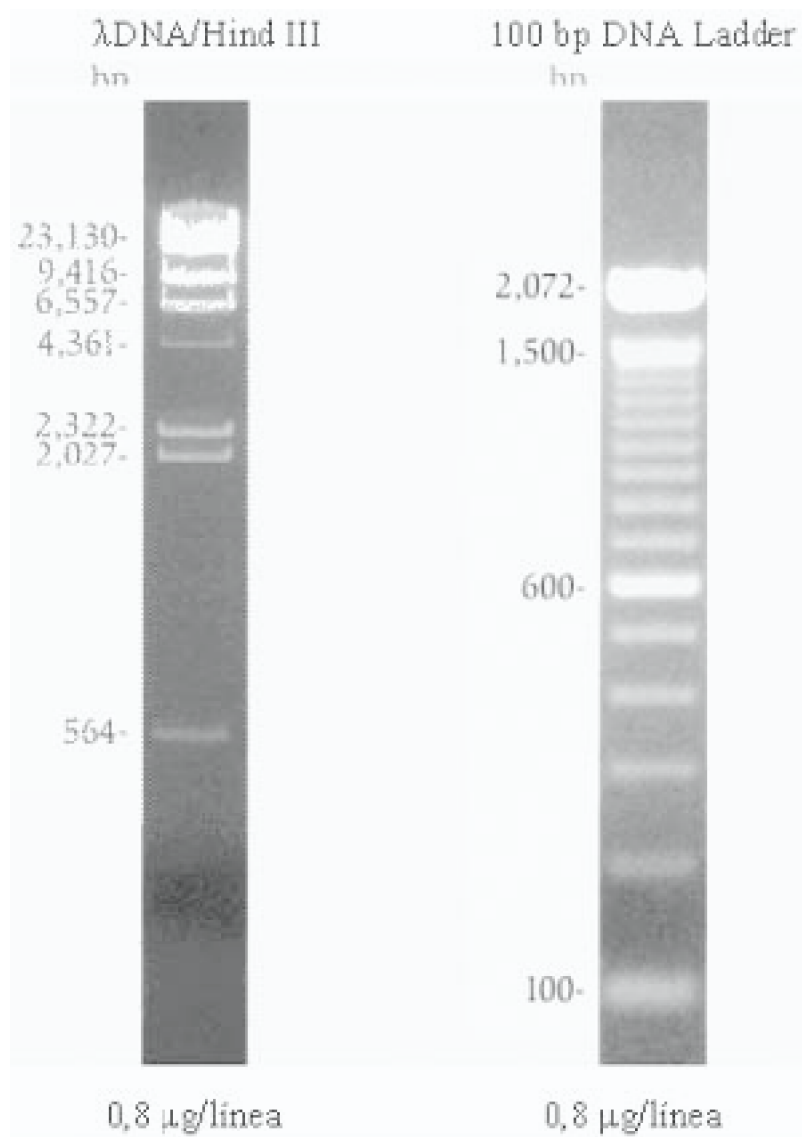


Gráfico N° 7. Características de los marcadores de peso molecular utilizados en la técnica del RAPD separados por electroforesis en geles de agarosa al 1,2%.

V. RESULTADOS

5.1. Extracción del ADN Genómico

El método de extracción del ADN genómico descrito por Boom⁷, resultó ser óptimo también para extraer ADN total a partir de sangre de alpacas; de las 30 extracciones en el 95% se obtuvo alta calidad y suficiente concentración de ADN, como se muestra en el Gráfico N° 8. La concentración de ADN que se requiere para realizar cada reacción es de 20 a 100 ng, mediante este método se pudo obtener una concentración promedio de 25-30 ng/μl. Esta etapa constituye un punto crítico ya que la integridad, concentración y pureza del ADN van a constituir un requisito indispensable para la realización de la prueba del RAPD y reproducibilidad de los resultados

En el 5% restante de muestras de ADN se presentaban impurezas, como se observa en el Gráfico N° 8 línea 1 indicado por la flecha, además las muestras 3092 y 3094 correspondientes a las líneas 4 y 8 respectivamente muestran una insuficiente concentración de ADN esto podría deberse a que no ha habido una correcta metodología para la extracción y conservación de las muestras de sangre permitiendo la lisis y activación de nucleasas que destruyen el ADN, otra de las razones sería una mala manipulación de la muestra en la etapa de extracción del ADN, por esta razón tuvo que extraerse nuevamente con los cuidados necesarios.



Gráfico N° 8. ADN Genómico de alpacas en gel de agarosa al 1% extraído según Boom y col.62

Líneas 1:3001; 2, 3004; 3, 3007; 4, 3009; 5, 3011; 6, 3013; 7, 3014; 8, 3015; 9, 3016; 10, 3017; 11, 3023; 12, 3051; Líneas 13 y 14, alpacas controles puro e híbrido Respectivamente; M: ADN fago lambda/HindIII (marcador de peso molecular)

Se realizó una purificación alternativa para los casos que presentaron impurezas con el Kit "Cyclo-Pure" (Invitrogen) según las condiciones del fabricante, cuyos resultados se muestran en el Gráfico N° 9, las muestras de las alpacas 3001 y 3526 presentes en las líneas 1 y 3 respectivamente muestran una disminución de impurezas, la concentración de ADN en estos casos es optima para realizar la prueba del RAPD. La muestra 3051 que se encuentra en la línea 2 baja concentración de ADN en un caso.

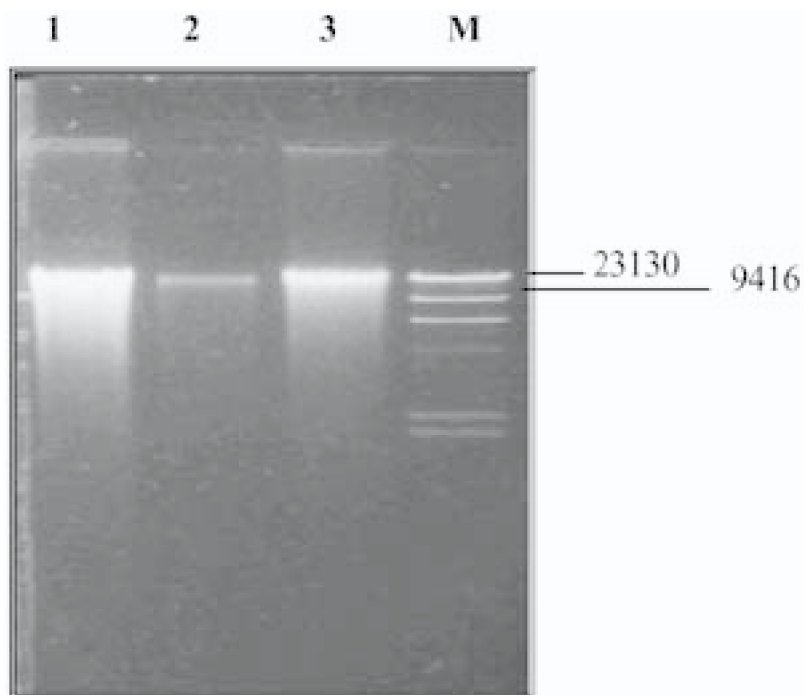


Gráfico N° 9. ADN genómico de alpacas purificados con el Kit "Cyclo Pure" (Invitrogen) en gel de agarosa 1%

Línea 1, 3001; 2, 3051; 3, 3526; M: ADN fago lambda/Hindi (marcador de peso molecular)

5.2. Estandarización del RAPD

Luego de la extracción de ADN genómico se prosiguió con la estandarización del RAPD, siguiendo el protocolo diseñado por Zavaleta⁶⁰, con las siguientes modificaciones que resultaron en aumento del número de bandas. Aproximadamente 100 ng de ADN genómico fue utilizado para la amplificación por PCR. Se optimizó el proceso con una concentración del cebador de 10pmol; *Taq* ADN-polimerasa 2U, y de $MgCl_2$ a 2,5 mM ubicándose dentro del rango óptimo para una PCR (0,5-5,0 mM). La concentración de magnesio tiene un efecto sobre la especificidad de los productos de PCR, forma un complejo soluble con los deoxinucleotidos para incorporarse al ADN estimulando la actividad de la *Taq* ADN-polimerasa si existe un exceso de Mg^{+2} resulta en una acumulación de productos no específicos; la concentración de deoxinucleotidos se mantuvo constante en 0,2 mM esta concentración óptima depende principalmente de la concentración de $MgCl_2$ y la concentración del primer. Con estas variaciones las bandas se visualizaron mejor y permitieron separarlos por disminución del voltaje en la corrida electroforética de 80 a 60 voltios mejorando la resolución de las mismas como se muestra en el Gráfico N° 10.

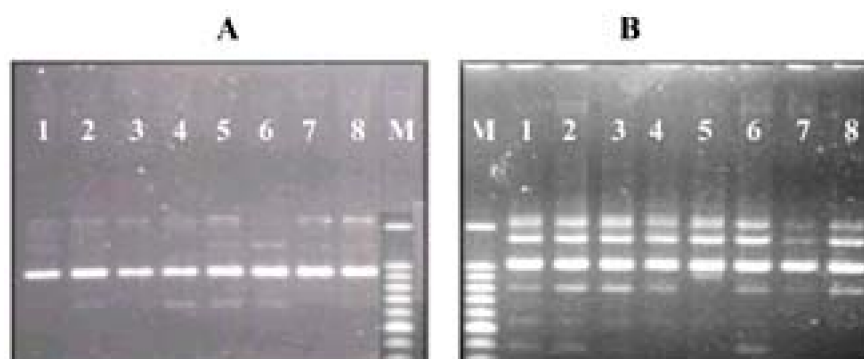


Gráfico N° 10. RAPD con el cebador OPA 18.

En A se observa amplificación de muestras antes de estandarización de parámetros en RAPD; en B se observa amplificación con protocolo desarrollado en el presente trabajo. Línea 1: alpaca pura; línea 2: alpaca; híbrida; Línea 3, 3001; 2, 3004; 3, 3007; 4, 3009; 5, 3011; 6, 3013; 7, 3014; 8, 3015M: Ladder 100pb.

5.3. Identificación de Cebadores informativos

La siguiente etapa corresponde a la identificación de los cebadores que sean más informativos, es decir aquellos que generen mas de una banda o un perfil de bandas de un tamaño molecular mayor a 200 pb y menor a 2000 pb. Se realizó la selección de cebadores con un subgrupo de animales, incluyendo los puros e híbridos bien

caracterizados. Los cebadores OPA-09, OPA-12, OPA-15, OPA-17, OPA-19, OPB-02, OPB-4, OPB-06, OPB-07, OPB-12, OPB-13, OPB-19, OPF-06, OPF-17, OPI-01, OPI-10, OPI-11, OPI-19 mostraron solamente 1 o 2 bandas que, dependiendo del cebador midieron entre 800 y 1000 pb, por lo tanto no se utilizaron estos cebadores ya que no generaron perfiles de bandas diferentes. en nuestra prueba el cebador OPA 17 mostró solamente una banda o fragmento de 800 pb aproximadamente, indicándonos que esté no genera bandas de diferentes tamaños. (Gráfico N° 11).



Gráfico N° 11. RAPD con el cebador OPA-17

Línea 1: alpaca pura; línea 2: alpaca; híbrida; Línea 3, 3001; 2, 3004; 3, 3007; 4, 3009; 5, 3011; 6, 3013; 7, 3014; 8, 3015; 9, 3016; 10, 3017; 11, 3023; 12, 3051; 13, 3053; 14, 3058; 15, 3075; 16, 3081; 17, 3082: muestras de alpacas; M: marcador de peso molecular 100 pb.

5.4. Estudio Molecular de *Lama pacos* con cebadores informativos

Al realizar la prueba del RAPD con los cebadores OPF 05, OPI 04, OPB 03, OPI 18, OPB 11, OPA 18, OPI 14, se obtuvieron numerosas bandas que varían en tamaño de acuerdo al primer utilizado, estas características hacen que estos cebadores podrían ser utilizados para determinar polimorfismos y relaciones de similitud genética en camélidos sudamericanos y por lo tanto en alpacas.

Al utilizar el cebador OPB 03, se obtuvieron numerosas bandas como se observa en la Gráfico N° 12, línea 16 en la alpaca pura control, no encontramos la banda de 700 pb que si aparece en las muestras y en el control de alpaca híbrida que se encuentra en la línea 15. Además la banda de aproximadamente 1200 pb de la alpaca pura control (línea 16) es mas intensa que las otras muestras incluyendo el control alpaca híbrida. En la línea 17 se encuentra el control de vicuña que presenta aproximadamente 11 bandas del mismo peso molecular que las alpacas pero algunas de muy baja intensidad. En la Figura 5 se puede observar una banda de aproximadamente 650 pb que aparece en las muestras 3100, 3091, 3094, 3053 de las líneas 7, 10, 14 y 17 respectivamente indicados por flechas.

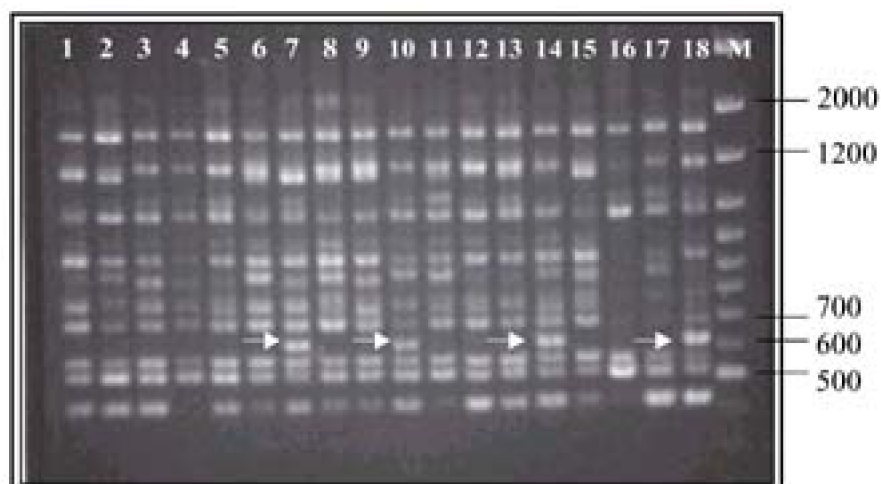


Gráfico N° 12. Prueba de RAPD PCR con el cebador OPB 03

Líneas 1, 3001; 2, 3058; 3, 3075; 4, 3082; 5, 3084; 6, 3086; 7, 3100; 8, 3007; 9, 3051; 10, 3091; 11, 3088; 12, 3081; 13, 3092; 14, 3094 y 18, 3053 Muestras de alpacas; línea 15: control alpaca híbrida; línea 16: control alpaca pura; línea 17: muestra de vicuña, M: ladder 100 pb

En el Gráfico N° 13 se muestra la prueba del RAPD con el cebador OPA-18 realizado en muestras del Cuzco; la alpaca pura control que se encuentra en la línea 11 no presenta bandas notorias de 1200 ni 1300 pb que si presentan las muestras en estudio. Además se puede observar en las alpacas 3016 y 3023 que corresponden a las líneas 5 y 10 una banda de aproximadamente 1000 pb, que no presentan las otras alpacas. Además, se observa una banda muy intensa de 1031 pb presentes en todas las muestras. Similares resultados se obtienen con animales procedentes de puno (Gráfico N° 14), las alpacas 3516 y 3527 de las líneas 7 y 15 presentan bandas de aproximadamente 1000 pb indicados con flechas amarillas que no presentan los otros animales

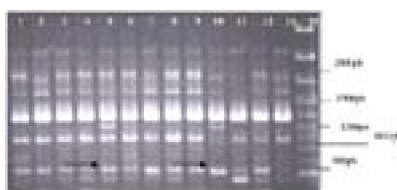


Gráfico N° 13. RAPD cebador OPA 18 para animales procedentes del Cuzco

Líneas 1, 3004; 2, 3011; 3, 3013; 4, 3014; 5, 3016; 6, 3501; 7, 3017; 8, 3009; 9, 3015; 10, 3023 y línea 13, 3013; línea 11: control alpaca pura; M: Ladder 100pb.

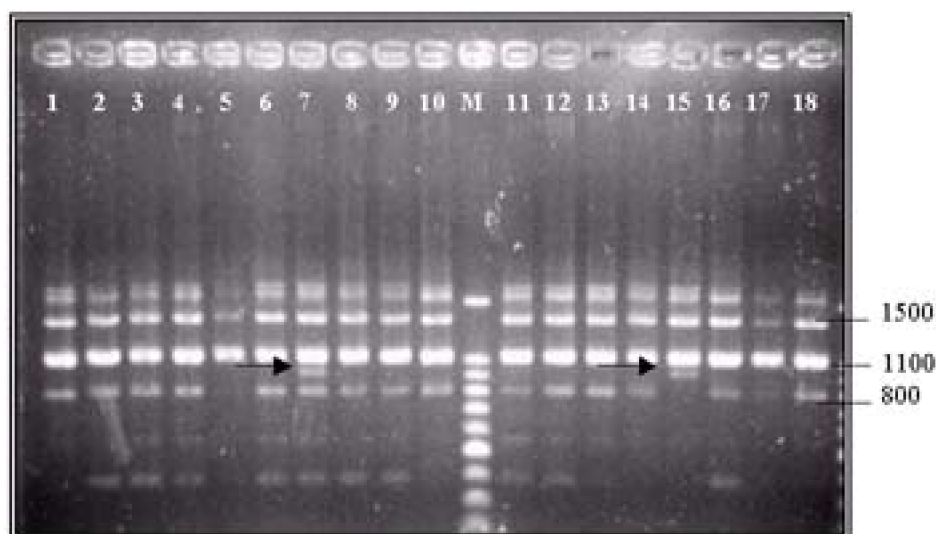


Gráfico N° 14. RAPD cebador OPA 18 para animales procedentes de Puno

Líneas 1, 3502; 2, 3505; 3, 3506; 4, 3508; 5, 3512; 6, 3514; 7, 3516; 8, 3517; 9, 3518; 10, 3521; 11, 3522; 12, 3523; 13, 3524; 14, 3526; 15, 3527; 16, 3541; línea 17: control alpaca pura; línea 18: control alpaca híbrida; M: Ladder 100pb.

Al realizar la prueba del RAPD con el cebador OPB-11 se puede observar que el control de alpaca pura en la línea 17 no presenta varias bandas que si presentan las alpacas y el control alpaca híbrida que se encuentra en la línea 16; la alpaca pura presenta bandas notorias de 1031, 900 y 600pb.

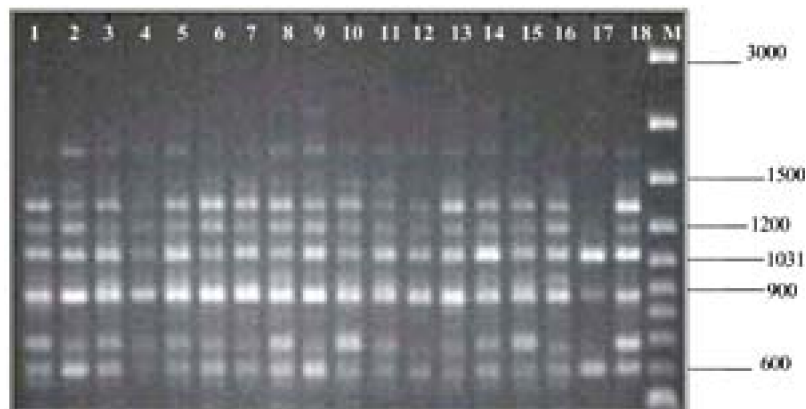


Gráfico N° 15. RAPD con cebador OPB 11

Líneas 1, 3001; 2, 3058; 3, 3075; 4, 3082; 5, 3084; 6, 3086; 7, 3100; 8, 3007; 9, 3053; 10, 3051; 11, 3091; 12, 3088; 13, 3081; 14, 3092; 15, 3094; línea 16: control alpaca híbrida; línea 17: control alpaca pura; línea 18: muestra vicuña; M: Ladder 100pb.

Se realizó la prueba del RAPD para el cebador OPI-14 cuyos perfiles de bandas no fueron similares entre las alpacas controles, alpaca pura, vicuña, ni guanaco, y las alpacas muestreadas sin embargo cabe destacar la notoriedad de bandas de 1300 pb que aparecen solo en algunas muestras y en la muestra de vicuña.

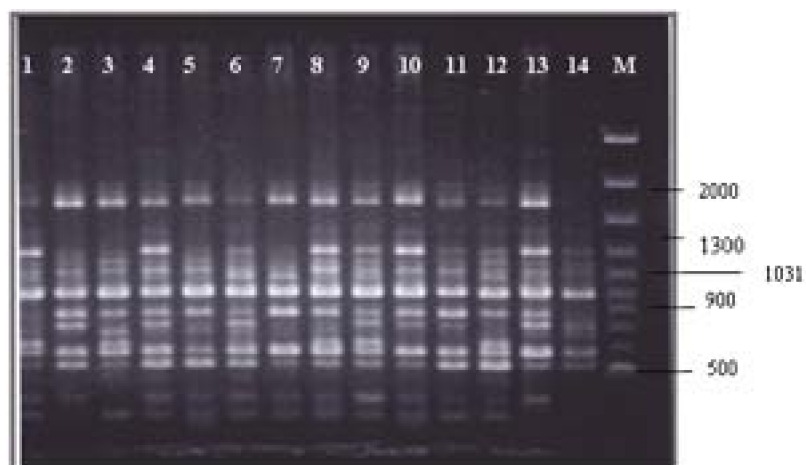


Gráfico N° 16. RAPD con cebador OPI 14

Líneas 1, 3004; 2, 3011; 3, 3013; 4, 3014; 5, 3016; 6, 3501; 7, 3017; 8, 3009; 9, 3015; 10, 3023; línea 11: control alpaca pura; línea 12: control alpaca híbrida; línea 13: muestra vicuña; línea 14: muestra guanaco; M: Ladder 100pb.

VI. DISCUSIÓN

El cruce más común en los camélidos sudamericanos es entre la llama y la alpaca, este híbrido, conocido como wari, está subdividido por los pastores tradicionales entre llama wari (semejante a llama) y paqowari (semejante a alpaca)¹⁵. Los wari reúnen características fenotípicas no deseables como una producción fibra de menor calidad que las alpacas. Los pastores evitan estos híbridos y eliminan los waris de sus rebaños para asegurar la pureza de las dos especies y sus probables razas³⁸. Sin embargo, este sistema de crianza se perdió con la invasión española, las alpacas encontradas momificadas hace 900 – 1000 años de antigüedad en el Yaral, por Wheeler⁵⁹, muestran uniformidad en la finura de fibra y color totalmente ausentes en animales actuales sugiriendo que ellos⁴⁷ representan variedades desconocidas o animales puros no hibridizados. Stanley⁴⁷ recomendó realizar otras técnicas para estudiar la relación de camélidos domésticos con sus ancestros silvestres ya que los datos del genoma mitocondrial no permiten diferenciarlos.

Es posible realizar una amplificación "al azar", siempre que se utilicen cebadores pequeños generalmente de 10 pares de bases y a temperaturas de hibridación muy permisivas entre 35 a 42 °C. El ADN genómico purificado es sometido a una PCR especial relajada, con hibridación a baja temperatura y cebadores muy cortos. Los cebadores se unen a distintas secuencias diana y comienzan a generarse amplicones de diferentes tamaños. Esto es muy importante, porque va a condicionar el hecho de que el RAPD presenta generalmente un patrón de segregación genética dominante; es decir, que no permitan diferenciar al heterocigoto de uno de los homocigotos. La razón de dicha segregación de tipo dominante es la posible mayor longitud de un amplicón en relación al

competidor, sobre todo, la diferente afinidad de cada oligo por sus dianas. Ello producirá diferentes reacciones en desigualdad de condiciones, entre los diferentes productos amplificados. Debe recordarse que la hibridación del oligo con la diana no suele ser perfecta; después de todo, son oligos inespecíficos.

De modo que, como la PCR sigue la "ley del todo o nada", no todos los posibles amplicones serán reamplificados con la misma eficiencia. Tendrán preferencia los más cortos y, sobre todo los menores a 2kb, aquellos en que los cebadores delimitantes tengan mayor afinidad por su diana. Esto puede hacer que, por ejemplo, en el heterocigoto no se generen los dos amplicones correspondientes a cada uno de los homocigotos, sino sólo el amplicón más competitivo. Ello representa una desventaja sobre todo para la generación de mapas genéticos de ligamiento físico (donde interesan genéticas de segregación codominante).

En el análisis basado en RAPD la primera etapa corresponde a la estandarización del método, como se observa en el Gráfico N° 10 la amplificación fue mejorada básicamente con variación en la concentración de $MgCl_2$ en 2,5 mM encontrándose dentro del rango óptimo de 0,5 -5,0 mM recomendado por Innis²¹; otro parámetro que se trabajó con especial interés fue la pureza del ADN, según Welsh⁵⁷ este parámetro es un punto crítico para que los resultados obtenidos por el RAPD sean óptimos.

Luego se realiza la identificación de cebadores que sean mas informativos en un determinado grupo de especies. Merabachvill y col³⁴ describen que OPA 17 es uno de los cebadores que genera perfiles de bandas diferentes y recomienda utilizarlo en estudios de filiación y de diversidad genética en camélidos sudamericanos. Este cebador, OPA-17, al ser empleado con muestras de alpacas de las dos razas no presentó bandas informativas ni polimorfas, sólo se obtuvo como producto de amplificación una banda de aproximadamente 800pb como se observa en el Gráfico N° 11, las diferencias de perfiles obtenidos por un autor u otro dependen de parámetros como pureza e integridad del ADN, la *Taq* ADN polimerasa seleccionada, concentración de $MgCl_2$ y las temperaturas de hibridación, para que dichos resultados sean reproducibles.

Como se puede observar en los Gráficos 12, 13, 14 y 15, el número de bandas polimorfas es reducido, aunque el numero total de bandas amplificadas es elevado, éstos podrían indicar que hay una población mayoritaria posiblemente de alpacas híbridas; Stanley⁴⁷ determinó mediante el estudio del ADN mitocondrial que solamente el 60 % de las alpacas son genéticamente puras. A la luz de los resultados existe una población mayoritaria de alpacas híbridas esto resulta por ejemplo en una baja calidad de fibra producida por las alpacas y llamas híbridas actuales resultando en un pobre ingreso económico para las familias campesinas; el precio de la fibra esta en relación al grosor, a mayor grosor menor precio así, las fibras menores de 22 μm de diámetro tienen un precio promedio de US\$ 90/Kg mientras que las de mayor grosor tienen un precio de US\$ 15/Kg y este último representa el 90% de la fibra producida por los campesinos. Las llamas y alpacas de la época pre Inca e Inca tenían fibra fina de 19 μm la cual podría competir con el cashmere que mide 17 μm . Recobrar el potencial perdido de la calidad de fibra y pureza en los camélidos actuales sería la mejor estrategia para reducir la pobreza de los productores campesinos.

Algunos cebadores presentaron bandas diferentes, así OPB-03 generó bandas de 650 pb en las alpacas 3100, 3091, 3094, 3053 y OPA-18 de 1000 pb en los animales 3016, 3023, 3081, 3516, 3527 esto podría indicar alguna mutación o variabilidad intraespecífica. También es destacable la notoriedad de la banda de 1031 pb que generó el cebador OPA-18 lo cual nos podría indicar un gen de múltiple copia o que existan fragmentos que comigran. Los cebadores OPI-14, OPB-03, OPF-05, OPB-11, OPI.04, OPI-18, OPA-18 mostraron un perfil de bandas diferentes entre alpacas híbridas y puros, pero no permitió diferenciar entre las razas suri y huacaya. Además, en la población estudiada no se encontró alpacas que tuvieran un perfil de bandas similares a los presentados por los animales puros, esto podría sugerir el grado de hibridación que existe debido a un inadecuado cuidado en el cruce de las alpacas como concluyo Velasco en 1981⁴⁸ mediante estudios fenotípicos.

El análisis de los patrones de RAPD obtenidos no permitieron diferenciar a los animales por la calidad de fibra o alguna otra característica fenotípica descrita en la tabla N° 4; Merabachvili³⁴ inicia el estudio de filiación genética mediante RAPD con 200 cebadores, el número de muestras y a pesar de que los reactivos son relativamente mas económicos que otras técnicas de PCR, fueron limitantes para hacer mas pruebas y determinar relaciones fenotípicas y genotípicas.

En conclusión, la técnica del RAPD es una metodología relativamente mas económica y menos complicada que la técnica de microsatélites y del ADN mitocondrial, pero los resultados obtenidos nos indica que la variabilidad genética detectada por estos marcadores RAPD en los animales estudiados es menor que la detectada utilizando microsatélites, se requiere seleccionar mas cebadores e incrementar el número de muestras, sin embargo, requiere que se controlen parámetros críticos como: pureza e integridad del ADN, la *Taq* ADN polimerasa seleccionada, concentración de $MgCl_2$ y las temperaturas de hibridación, a fin de que los resultados sean reproducibles.

CONCLUSIONES

1. La estandarización del RAPD demostró ser útil para el estudio molecular de *Lama pacos*.
2. Se seleccionaron 7 cebadores específicos e informativos, OPF-05, OPI-04, OPB-03, OPI-18, OPB-11, OPA-18, OPI-14; los cuales generaron perfiles genéticos diferentes.
3. No se encontró relación entre los perfiles genéticos con las características fenotípicas de las alpacas seleccionadas.

RECOMENDACIONES

1. Utilizar la técnica del RAPD-PCR para el estudio molecular de *Lama pacos*, empleando mayor número de cebadores e incrementando la cantidad de muestras.
2. Profundizar estudios para relacionar el polimorfismo genético y las características fenotípicas en alpacas.
3. Debido a que el RAPD es una técnica relativamente sencilla y barata se puede utilizar en el estudio de otros camélidos.

BIBLIOGRAFÍA

- Agundez D., Cervera M. Alban N. 1999. Genetic identification of comercial clones of Populus based on isozymes and AFLPs. Proc. of Appli. Of Biotech. To Forest Genet.22:549-552.
- Antonio Brack, 2001 Instituto Peruano de la Alpaca y Camélidos y la Sociedad Peruana de Criadores de Alpacas Registradas, Programa de las Naciones Unidas para el Desarrollo (PNUD).
- Atienzar F., Venier P., Jha A., Depledge M. 2002. Evaluation of the random amplified polymorphic DNA (RAPD) assay for the detection of DNA damage and mutations. *Mutation Research*. 521:151 – 163.
- Atienzar F., Evenden A., Savva D. 2000. Optimized RAPD análisis generates high-quality genomic DNA profiles at high annealing temperature. *Bio techniques*. 28: 52-54.
- Beeman R. 1999.RAPD-Based Genetic Linkage Maps of *Tribolium castaneum*. *Genetics* 153: 333–338.
- Bianchi, E. 1998. Estudios Geneticos y Reproductivos en Camelidos Sudamericanos. *Ciencia Americana* 23:28-32
- Boom R., Sol C., Salimans M., Jansen C.L., Wertheim-Van Dillen P., Van Der Noordaa J. 1990. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *J. Clin. microbiol.* 28, 495–503.

- Bunch, T.D.; Foote, W.C. y Maciulis, A. 1985. Chromosome banding pattern homologies and NORs for the Bactrian camel, Guanaco and Llama. *J. Heredity*. 76:115-118.
- Bustanza, V. 1995. Suri y Wacaya, razas de alpacas del altiplano. Centro de publicaciones IIDSA. Universidad del Altiplano. Puno, Perú.
- Cardoso M., Provan J., Powell W. 1988. High genetic differentiation among remnant populations of the endangered *Caeselpinia echinata*. *Molecular biology* 7:501-508.
- Castaño, A., Becerril, C., Garcia P. 2002. Detection of genotoxicity by RAPDs on fish cells after acute and chronic exposure to B[a]P, in: Proceedings of the 12th SETAC Europe Annual Meeting, Vienna, Austria, P. 233
- Cuenca B., San José M., Martínez M. 1999. Somatic embryogenesis from stem and leaf explants of *Caeselpinia echinata*. *Plant Cell Report*. 17:538-543.
- Fernandez- Baca, S. 1977. La alpaca, reproducción y crianza. Instituto Veterinario de Investigaciones Tropicales y de Altura (IVITA). Boletín de Divulgación Numero 7. Lima, Perú.
- Flores Ochoa, J.A. 1992. El hombre y su Ambiente en los Andes Centrales. Osaka, National Museum of Ethnology. 10: 63-92.
- Flores Ochoa, J.A. 1977. Pastores de Alpacas de los Andes. Compilador Pastores de Puna, 15-52. Lima, Instituto de Estudios Peruanos.
- Gray, A.P. 1954. Mammalian Hybrids. Slough, Commonwealth Agricultural Bureaux.
- Gravesen, T. Jacobsen, P.L. Moller, F. Hansen, A.G. Larsen, S. Knóchel. 2000. Genotyping of *Listeria monocytogenes*. Comparison of RAPD, ITS, and PFGEA. *International Journal of Food Microbiology*. 57:43 – 51.
- Harris E. 1988. A Low-Cost Approach to PCR. Oxford University Press, UK.
- Holben, W. E., 1997. DNA based monitoring of total bacterial community structure in environmental samples. *Mol. Ecol*. 4, 627-631.
- Hoffstetter, R. 1986. High Andean Mammalian Faunas During the Plio-Pleistocene. *High Altitude Tropical Biogeography*. 218-245. Oxford University Press.
- Innis A. M. 1995. PCR strategies. Second Edition. Academic Press, UK
- Izquierdo Rojo M. 1999. Ingeniería genética y transferencia génica. Ed. Pirámide, España.
- Jimenez P., Agundez D. 2000. Genetic variation in central and marginal populations of *Quercus suber*. *Silvae Genetica*. 48: 278 – 284.
- Jones C., Kortenkamp A. 2000. RAPD library fingerprinting of bacterial and human DNA: applications in mutation detection teratogen. *Carcinogen. Mutagen*. 20: 49– 63.
- Kadwell, M., Fernandez, M. et al. 2001. Genetic analysis reveals the wild ancestors of the llama and the alpaca. *Proc.R.Soc.Lond.B*. 268, 2575 – 2584.
- Kerr, K. G., Kite, P., Heritage, J. 1995. Typing of epidemiologically associated environmental and clinical strains of *Listeria monocytogenes* by random amplification of polymorphic DNA. *J.Food Prot*. 58: 609-613
- Koford, C.B. 1997. The vicuña and the puna. *Ecological monographs*. 27: 153-219.
- Larkin P. J., Scowcroft W. 1981. Somaclonal variation a novel source of variability from

- cell cultures for plant improvement. *Theoretical and Applied Genetics*. 60: 197-214.
- Legates, J. Y Warwick, E. 1999. *Breeding and improvement of Farm Animals*. Eight Ed. Mc Graw-Hill Publications in the Agricultural Sciences. New York, USA.
- Lin D., Hubbes M., Zsufra L., 1994. Differentiation of poplar and willow clones using RAPD fingerprints. *Tree Physiology*, 14:1097-1105.
- Linnaeus, C. 1758. *Systema Naturae per Regna tria Naturae, Secundum Classes, Ordines, Genera, Species cum Characteribus, Differentiis, Synonymis, Locis*. Editio decima, Reformata. Holmiae, Laurentii Salvii.
- Mac Donagh, E.J. 1940. Observaciones sobre Guanacos cruzados con Llamas. *Revista del Museo de la Plata Zoología* 2(10):5-84.
- Mayr, E. 1963, *Animal Species and Evolution*. Ed. The Belknap Press of Harvard University Press. Massachusetts, U.S.A. 797 pp.
- Merabachvill, G., Obreque, V., Mancilla, R. 1999. Uso de marcadores moleculares para estudios de filiación y de diversidad genética de camélidos sudamericanos. Libro resumen Instituto de Investigaciones Agropecuarias. 27-44
- Miller, G.R. y Gill, A.L. 1990. Zooarchaeology at Pirincay, a Formative Period Site in Highland Ecuador, *Journal of Field Archaeology* 17:49-68.
- Morera, L., Barbancho J., Barba C. 2001. Detección de variabilidad genética por microsatélites en el Alano español. *Arch. Zootec.* 48:72-77.
- Mullis, K.B. 1990. The unusual origin of the polymerase chain reaction. *Scientific American*, 262:56-65.
- Murra, J.V. 1965. Herds and Herders in the Inca State. *Man. Culture and Animals*. 78:18 –215.
- Newton, C. R. 1997. *PCR Second Edition*, BIOS. Oxford University Press, UK
- Penner, G. A., Bush, A. Wise, Domier, L., 1993. Reproducibility of Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) analysis among laboratories. *PCR Meth. Appl.* 2:341-345.
- Pumayalla, A. 1995. Sistema de producción y consumo de los camélidos domésticos en el Perú. Volumen III Parte A. Junta del Acuerdo de Cartagena. Lima, Perú.
- Rima B. Frankiin, Douglas R. Taylor, Aaron L. Mills. 1999. Characterization of microbial communities using randomly amplified polymorphic DNA (RAPD)..*Journal of Microbiology Methods*. 35: 225 –235.
- Sanz M. L., Capote B. C. 2001. Detección de variabilidad de razas caninas. *Arch. Zootec.* 50:379-382.
- Sanchez N., Grau M., Manzanera J. M. 1999. RAPD markers for the identification of *Populus* species clones. *Proceedings of Application of Biotechnology to Forest Genetics*..22:125-128.
- Santiago R. 2002. Buscan mejorar precio de exportación de alpaca. *Gestión*, 25: 35-36. Perú.
- Shimada, M. 1995. Prehistoric Llama Breeding and Herding on the North Coast of Peru. *American Antiquity*. 50 (1):3-26.
- Stanley F., Kadwell M., Wheeler J. C. 1994. Molecular evolution of the family Camelidae: a mitochondrial study. *Proc. R. Soc. Lond. B.* 256:1-6.

- Velasco, J.; Condorena, N.; Novoa, C.; Sumar, J. Y Franco, E. 1981. Herencia del color y tipo de fibras en alpacas. Resúmenes de Proyectos de Investigación realizados en la UNMSM, 1975-1979. Lima, Perú.
- Vendrame W. A. Cochert G. 1999. AFLP analysis of variation in pecan somatic embryos. *Plant. Cell Tissue and Organ Culture*. 37:287-295.
- Vidal – Rioja, L.; Semorile, L. Y Crisci, J. 1991. Genética Molecular de camélidos. Análisis de filogenia mediante digestión del ADN con enzimas de restricción. VII Convención Internacional de Especialistas en Camélidos Sudamericanos. Jujuy, Argentina.
- Vidal – Rioja, L.; Larramendy, M. y Semorile, L. 1990. Ag-NOR staining and in situ hybridization of rDNA in chromosomes of the South American camelids. *Genetics*. 72:137-146
- Villaroel L. J. 1992. Algunas verdades sobre la fibra de alpaca. Boletín, Granja modelo de auquénidos. La Raya. Perú
- Villaroel L. 1962. A study of Alpaca Fibre. M. Sc. Thesis. The univ. Of New South Wales. Australia.
- Villavicencio de Izquierdo, D. Y Reynafarge, C. 1998 Características electroforéticas de la hemoglobina en alpacas. *Sociedad Química Peruana*. 37(2):48
- Waly D., Tharreau D. 1997. RAPD-based screening of genomic libraries for positional cloning. *Nucleic Acids Research*. (25): 24-25.
- Webb, S.D. 1974. Pleistocene llamas of Florida, with a brief review of the Lamini. *Pleistocene Mammals of Florida*. 32: 170-213.
- Welsh, J. and McClelland, M. 1990. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers, *Nucl. Acids Res*. 19, 303-306.
- Wheeler J. C., Fernandez M., Rosadio R. 2001. Diversidad genética y manejo de poblaciones de vicuñas en el Perú. *RIVEP*. 1:170-183.
- Wheeler J. C., Russel A. J., Redden H. 1995. Llamas and alpacas: pre-conquest breeds and post-conquest hybrids. *J. Archaeol. Sci*. 22:833-840.
- Wheeler, J.C. 1988. Origin and evolution of the South American Camelidae. Selected Papers Western Veterinary Conference. 290-300. Las Vegas, Western Veterinary Conference.
- Williams, J.G.K., Kubelik, A.R., Livak, K.J., Rafalski, J.A., and Tingey, S.V. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers, *Nucl. Acids Res*. 18, 6531-6535.
- Wing, E.S. 1986. Domestication of Andean Mammals. *Compiladores, High Altitude Biogeography*. 24: 246-264.
- Zavaleta A. I., Martínez-Murcia A., Rodríguez-Valera F. 1997. Intraespecific genetic diversity of *Oenococcus oeni* as derived from DNA fingerprinting an sequence analyses. *Applied and Environmental Microbiology*. 6: 1261-1267.