

**UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA  
FACULTAD DE VETERINARIA**

**ANÁLISIS GENÉTICO EN PASTOR ALEMÁN Y DOBERMAN DE LA MUTACIÓN  
*MDR1-1Δ* ASOCIADA CON SENSIBILIDAD A FÁRMACOS**

**"por"**

**Diana Carol MARTÍNEZ ACOSTA  
Beatriz TELLECHEA HERNÁNDEZ**

TESIS DE GRADO presentada como uno de los  
requisitos para obtener el título de Doctor en  
Ciencias Veterinarias  
Orientación: Medicina Veterinaria

MODALIDAD: Trabajo de Investigación

**MONTEVIDEO  
URUGUAY  
2013**

## PÁGINA DE APROBACIÓN

Tesis de grado aprobada por:

Presidente de mesa:

---

Dr. Alejandro Benech

Segundo miembro (Tutor):

---

Dra. Rosa Gagliardi

Tercer miembro:

---

Dr. Gonzalo Suárez

Cuarto miembro (Co-tutor):

---

Dra. Silvia Llambí

Fecha:

29 de noviembre de 2013

Autores:

---

Diana Carol Martínez Acosta

---

Beatriz Tellechea Hernández

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradecemos al Área Genética, en especial a la Dra. Rosa Gagliardi y Dra. Silvia Llambí por brindarnos la oportunidad de realizar nuestro trabajo final.

Al Laboratorio de Técnicas Nucleares.

A las funcionarias de Biblioteca por su apoyo en la búsqueda bibliográfica.

A compañeros de facultad, amigos, veterinarios y docentes del Hospital de ésta Facultad que colaboraron en la recolección de muestras.

A los propietarios de los perros que participaron de esta Tesis.

A nuestros compañeros de trabajo por su buena voluntad que nos permitió disponer del tiempo necesario para realizar este trabajo.

A nuestra familia, por contribuir en todo sentido con nuestra carrera.

## Tabla de Contenido

---

PÁGINA DE APROBACIÓN	2
AGRADECIMIENTOS	3
Lista de Figuras, Fotos y Cuadros	5
RESUMEN	6
SUMMARY	7
INTRODUCCIÓN	8
REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	9
Fundamentación	9
Farmacogenética	9
Transporte de fármacos	9
Gen <i>MDR1</i> y Glicoproteína P	10
Drogas sustrato de la Glicoproteína P	11
Drogas inductoras de la Glicoproteína P	11
Drogas inhibidoras de la Glicoproteína P	11
Mutación <i>MDR1-1Δ</i> y su implicancia clínica	11
Razas caninas implicadas	12
Razas propuestas: Pastor Alemán y Doberman	13
Antecedentes	15
OBJETIVOS	18
HIPÓTESIS	18
MATERIALES Y MÉTODOS	19
Población muestreada	19
Toma de muestras	21
Extracción de ADN genómico a partir de sangre entera	21
Medida de la concentración de ADN (cuantificación)	22
Genotipado	23
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	24
Cuantificación de ADN	24
Resultados de Gene Seek	24
CONCLUSIONES	26
BIBLIOGRAFÍA	27
Anexos:	
1. Frecuencia de los genotipos de <i>MDR1</i> según estudios de genotipificación en todo el mundo	29
2. Frecuencia de los genotipos de <i>MDR1</i> en Pastor Blanco Suizo	34
3. Datos de los caninos Pastor Alemán muestreados	35
4. Datos de los caninos Doberman muestreados	37
5. Resultados de Nanodrop de las muestras de Pastor Alemán	39
6. Resultados de Nanodrop de las muestras de Doberman	41
7. Resultados de genotipado de las muestras de Pastor Alemán y Doberman	43
8. Fotos propias	47

---

## Lista de Figuras, Fotos y Cuadros

---

### Figuras:

- |   |    |
|---|----|
| 1. Rol de la Glicoproteína P en los diferentes tejidos donde se encuentra                   | 10 |
| 2. Gen <i>MDR1</i> mostrando sitio de la delección  | 12 |
| 3. Electroforesis en gel de poliacrilamida identificando los tipos de bandas según genotipo | 16 |
| 4. Ficha de identificación  | 20 |
| 5. Resultados de genotipado   | 24 |

### Fotos:

- |  |    |
|--|----|
| 1. a) Pastor Alemán , b) Pastor Blanco Suizo | 13 |
| 2. a) Doberman marrón, b) Doberman negro     | 14 |
| 3. Nanodrop ND-1000                          | 23 |

### Cuadros:

- |   |    |
|---|----|
| 1. Reportes de intoxicación con Ivermectina en perros de razas no consideradas con <i>MDR1-1Δ</i> | 17 |
| 2. Antecedentes de tratamientos y reacciones adversas (RA) a LMC                                  | 19 |
-

## RESUMEN

El gen *MDR1* codifica una proteína de transporte transmembrana (Glicoproteína P) que se distribuye en diversos tejidos como por ejemplo la barrera hematoencefálica. Cuando este gen presenta la mutación *MDR1-1Δ* genera un producto que es una proteína afuncional, ocasionando que ciertas drogas como la ivermectina (antiparasitario de amplio espectro) se acumulen en el cerebro provocando neurotoxicidad.

Los animales portadores (homocigotas o heterocigotas) presentan un fenotipo sensible a la ivermectina con signos de neurotoxicidad incluyendo salivación, temblores, ataxia, desorientación, letargia, depresión, midriasis, etc.

Por otra parte, es de gran importancia considerar que además de la ivermectina, existen otras drogas sustrato de la Glicoproteína P, con las que también debe tenerse precaución al usarse en animales sensibles, ya que pueden causar signos clínicos adversos.

Con el fin de determinar la presencia o no de la mutación en dos razas de nuestro interés, se analizaron al azar 34 perros de la raza Pastor Alemán y 31 de la raza Doberman.

El protocolo experimental consistió en la obtención de ADN a partir de una muestra de sangre de cada animal. Las muestras se cuantificaron utilizando el Nanodrop ND1000 y luego fueron enviadas para genotipar al laboratorio Gene Seek de Chicago, Estados Unidos.

Los resultados obtenidos indican que no se encontró la mutación.

Esto no descarta que perros de estas razas presenten reacciones adversas luego de la administración de ivermectina u otros fármacos, ya que existen otras posibles causas responsables de ello.

## SUMMARY

The *MDR1* gene codes a transmembrane protein (P-glycoprotein) distributed to several tissues such as the blood-brain barrier. When this gene mutates to *MDR1-1Δ*, generates a non-functional protein, causing some drugs such as the Ivermectin (broad-spectrum antiparasitic), to accumulate in the brain by provoking neurotoxicity. Animals carrying (homozygous or heterozygous) show an ivermectin sensitive phenotype with neurotoxicity signs, including salivation, tremors, ataxic, disorientation, lethargy, depression, mydriasis, etc. On the other hand, it is of great importance to consider that in addition to ivermectin there are other p-glycoprotein substrate drugs. Precautions should be taken when using these drugs in sensitive animals since they can cause adverse clinic signs. Our aim was to determine the presence or absence of mutation in two dog breeds of our interest. We randomly analyzed 34 German Shepherd and 31 Doberman. The experimental protocol consisted of DNA obtention from a blood sample of each animal. The samples were quantified with Nanodrop ND 1000 and after that they were sent for genotyping to Gene Seek Laboratory of Chicago, United States of America. The mutation was not found. This does not mean that dogs belonging to the mentioned breeds have adverse reactions after ivermectin administration or other drugs, since there are other possible causes responsible for this effect.

## INTRODUCCIÓN

En caninos se realizan diferentes maniobras que tienen como fin preservar la salud de los animales así como también evitar las zoonosis (enfermedades transmitidas de los animales al humano). Entre estas maniobras, los tratamientos antiparasitarios son un manejo de rutina, así como también las vacunaciones, etc. A lo largo de los años, para realizar la desparasitación de los animales se han empleado diferentes drogas, entre las que se encuentra la familia de las lactonas macrocíclicas y en particular la ivermectina, antiparasitario de amplio espectro que ha demostrado ser efectivo frente a endo y ectoparásitos (droga endectocida). Debido al éxito que presentó, comenzó a ser muy utilizada en Medicina Veterinaria a partir de los años 80. A partir de ese momento, se comenzaron a describir signos de sensibilidad (neurotoxicidad) luego de su administración, siendo el primer caso descrito en perros de raza Collie en el año 1985 (Pulliam y col., 1985). Posteriormente se vincularon estos casos con lo sucedido en un laboratorio en el que se empleaban ratones, donde debido a una infestación con ácaros se realizó la fumigación del laboratorio con ivermectina, lo que causó la muerte de gran cantidad de estos ratones. Luego se vio que estos animales eran portadores de una mutación en el gen *MDR1* (gen de resistencia a múltiples drogas) que codifica para la proteína de transporte llamada Glicoproteína P (Dowling y col., 2006; Mealey y col., 2001). Dadas las situaciones descritas, la Dra. Mealey profundizó en el estudio de este gen en caninos, particularmente de raza Collie, demostrando que se presentaba una mutación: *MDR1-1Δ*, consistente en la pérdida de 4 pares de bases, en los animales con fenotipo sensible a la ivermectina. Esto implica que se produzca una Glicoproteína P menor al 10% de lo normal, lo que lleva a que dicha proteína no cumpla con su función. Como resultado de ello, esta proteína permite la entrada al Sistema Nervioso Central de ciertas drogas como la ivermectina, produciendo síntomas neurológicos que pueden llevar a la muerte del animal.

Posteriormente se continuó la búsqueda de esta mutación en animales que habían presentado signos de neurotoxicidad a lactonas macrocíclicas y a otros fármacos sustrato de la Glicoproteína P. Se realizaron estudios en razas de perros relacionadas al Collie (del linaje Collie) y otras que no se consideraban en ese grupo. De esto surge una amplia lista de razas caninas en las cuales se ha encontrado la mutación mencionada, las cuales deben ser tenidas en cuenta a la hora de administrar un fármaco sustrato de la Glicoproteína P para poder optar por el tratamiento que el veterinario considere más seguro para su paciente.

## REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

### Fundamentación

#### Farmacogenética

La Farmacogenética es el estudio de los determinantes genéticos de la respuesta a la terapia farmacológica a modo de establecer el fármaco y la dosis adecuada para cada paciente optimizando la eficacia y minimizando la toxicidad. En humanos, esto lleva a la individualización de la terapia farmacológica cuya importancia clínica abarca la capacidad de predecir los pacientes con alto riesgo de desarrollar toxicidad al fármaco, así como también aquellos con mayor probabilidad de beneficiarse de un determinado fármaco (Mealey, 2006).

En Medicina Veterinaria la tendencia es llegar a este objetivo, pero aún resulta difícil de concretar.

El tratamiento farmacológico se ve afectado por muchos factores, entre los que se encuentra la edad del paciente, el estado de salud o de enfermedad, los medicamentos utilizados simultáneamente, la especie, etc. Existe variabilidad de respuesta a los fármacos entre diferentes pacientes, que puede ser como resultado de variaciones genéticas en: el metabolismo del fármaco, la distribución y las proteínas diana.

Partimos de la base de que un gen es la secuencia de ADN que representa una serie de codones (tres bases de nucleótidos consecutivos forman un codón) que determinan una proteína específica; cuando se expresa un gen el ADN se transcribe en ARN que luego se traduce en proteínas.

Una mutación en un determinado gen altera la secuencia de ADN cuyo producto podrían ser proteínas afuncionales o disfuncionales. Esta variación genética puede afectar la farmacocinética (absorción, distribución, metabolismo y excreción) y la farmacodinamia (interacción con transportadores y receptores) de los fármacos (Mealey, 2006).

#### Transporte de fármacos

En particular, el transporte de fármacos a través de la membrana celular se realiza mediante diferentes mecanismos; uno de los cuales es a través de proteínas, destacándose la familia de los ATP-binding cassette (ABC). Los genes ABC representan la mayor familia de proteínas transmembrana, están ampliamente distribuidos en el genoma eucariota y altamente conservados entre especies. Hay siete subfamilias, una de ellas es la subfamilia ABCB en la que se encuentra el gen *MDR1(ABCB1*, gen de resistencia a múltiples drogas) quien fue el primer transportador humano clonado y caracterizado por su capacidad de conferir el fenotipo de resistencia a múltiples drogas a células tumorales que habían desarrollado resistencia a quimioterápicos (Dean, 2001).

En caninos de raza Collie fue analizado y vinculado con la sensibilidad a la ivermectina (Mealey y col., 2001).

## Gen *MDR1* y Glicoproteína P

En el perro el gen *MDR1* se localiza en el cromosoma 14 y está compuesto por 28 exones (segmentos codificantes)(Gagliardi, 2009). Codifica para la proteína transmembrana conocida como Glicoproteína P (Gp-P) la que se distribuye en diversos tejidos como en intestino (borde en cepillo de la membrana del enterocito), hígado (membrana canalicular de los hepatocitos), riñón (membrana de los túbulos proximales), placenta, capilares de testículos y cerebro formando parte de la barrera hematoencefálica sobre la cual ejerce una función protectora, limitando el ingreso de drogas y otros xenobióticos (compuestos químicos sintetizados por el hombre) hacia el Sistema Nervioso Central (SNC) (Geyer y col., 2005).

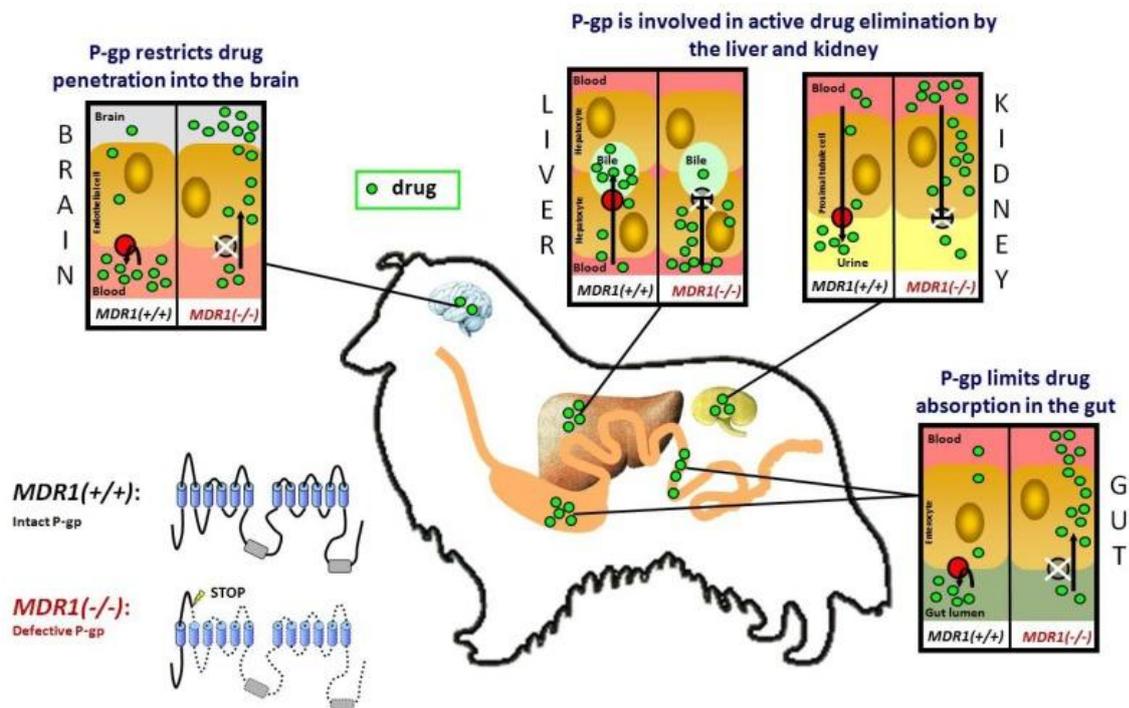


Figura 1. Rol de la Gp-P en los diferentes tejidos donde se encuentra (extraído de Geyer y col., 2012).

Esta proteína transporta una amplia variedad de moléculas que se consideran su sustrato, con diferente estructura química pero que comparten la característica de ser hidrófobas, de presentar bajo peso molecular, ser neutras o con carga positiva. La interacción entre el sustrato y la glicoproteína se altera de acuerdo a la presencia de determinadas moléculas que pueden ser inhibidoras o inductoras. Las inhibidoras reducen la acción de la Gp-P provocando una menor tasa de eliminación del sustrato permaneciendo durante más tiempo en plasma, mientras que las inductoras aceleran su eliminación (<http://www.elcollie.es/archivos/collies-medicamentos>).

0078zzzzz

### **Drogas sustrato de la Glicoproteína P**

- Antiparasitarios: ivermectina, doramectina, milbemicina oxima, selamectina, levamisol.
- Antidiarreico: loperamida.
- Antieméticos: metoclopramida, domperidona.
- Quimioterápicos: vincristina, doxorubicina, vinblastina.
- Antibióticos: doxiciclina, eritromicina, ciprofloxacina, azitromicina, tetraciclina.
- Antifúngicos: ketoconazol, itraconazol.
- Antihistamínicos: cimetidina y ranitidina.
- Drogas cardíacas: digoxina, losartán.
- Esteroides: cortisol, dexametasona, estradiol, hidrocortisona, metilprednisolona.
- Otros: fenobarbital, acepromazina, butorfanol, fenotiazinas, morfina, fentanilo. (Dowling, 2006; Geyer y col., 2005; Mealey, 2004; Neff y col., 2004; Fromm, 2004).

- Drogas inductoras de la Glicoproteína P

Dexametasona, rifampicina y como producto natural la Hierba de San Juan.

- Drogas inhibidoras de la Glicoproteína P

Se han descrito las siguientes : Ivermectina, vincristina, vinblastina, ciclosporina, amiodarona, loperamida, azitromicina, claritromicina, doxorubicina, eritromicina, itraconazol, ketoconazol, progesterona, espiranolactona, productos naturales como jugo de naranja, pomelo y uva. (<http://www.elcollie.es/archivos/collies-medicamentos>).

### **Mutación *MDR1-1Δ* y su implicancia clínica**

En humanos se han descrito polimorfismos (variaciones genéticas presentes en 1% o más de la población) del gen *MDR1*, que dan como resultado la alteración en la farmacocinética de algunas drogas, susceptibilidad a enfermedades como Parkinson, enfermedad inflamatoria intestinal, convulsiones refractarias, resistencia a quimioterápicos en células tumorales etc. (Bissonnette y col., 2008).

En caninos se detectó un polimorfismo en razas de perros pastores (principalmente en Collies) y lebreles, que tiene como consecuencia la sensibilidad a la ivermectina y otras drogas sustrato de la Gp-P. Este polimorfismo es una mutación por delección de 4 pares de bases (pb) en el cuarto exón del gen *MDR1*.

Esta delección causa un cambio de marco en la posición del aminoácido 75 seguido de un codón de parada (codón stop) prematuro en la posición del aminoácido 91. El resultado es una proteína truncada no funcional (Mealey y col., 2001).

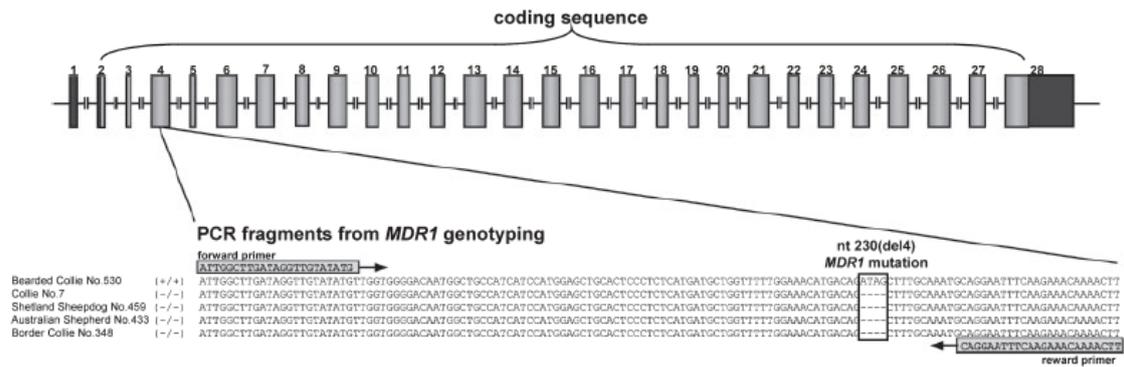


Figura 2. Gen *MDR1* mostrando sitio de la delección (extraído de Geyer y col., 2005).

El sitio donde se presenta la delección se muestra en la siguiente secuencia destacándose en color rojo:

TATTTGGAAAGTAGAGCAAACCTATCCATGAAACTGTGCTAATTTCTATTCTTTACA  
 TTTTCTTTCTTTTTTTTTTTTTTTAGTTTCGCTATTCAAATTGGCTTGATAGGTTGT  
 ATATGTTGGTGGGGACAATGGCTGCCATCATCCATGGAGCTGCACTCCCTCTCAT  
 GATGCTGGTTTTTTGGAAACATGAC **AGAT**AGCTTTGCAAATGCAGGAATTTCAAGA  
 AACAAAACCTTTCCAGTTATAATTAATGAAAGTAAGTATTATTTGTGGCACTGATCTT  
 AGAGGTTTGAAGAAAATCTGTTACTTAGAAGGATGTTTAGCCCTCATTAAATACA  
 TTAGTGTTTATTCTGGGGGAAAAGGGG

Cuando se presenta dicha mutación (*MDR1-1Δ*) se genera una proteína afuncional y en consecuencia, ciertas drogas como la ivermectina se acumulan en el cerebro (y otros órganos) provocando neurotoxicidad (Mealey y col., 2001). Los animales homocigotas (con dos alelos mutantes) presentan un fenotipo sensible, ocasionando un cuadro clínico severo de neurotoxicidad al administrarse ivermectina a dosis recomendada (200ug/kg) siendo fatal para el animal. Por otra parte, en los heterocigotas (un alelo mutante y un alelo normal) la cantidad de Gp-P funcional no es suficiente para el normal funcionamiento, aunque no suele ser fatal. Pese a esto, es muy importante tener en cuenta que estos animales son portadores y transmiten la mutación a su progenie (<http://www.elcollie.es/archivos/collies-medicamentos>). Los signos neurológicos que se han descrito en los animales afectados por *MDR1-1Δ* luego de la administración de ivermectina y otras drogas sustrato de Gp-P son: salivación, temblores, ataxia, desorientación, letargia, depresión, cambios de comportamiento, ceguera, debilidad, midriasis, recumbencia y coma (Bissonnette y col., 2008).

### Razas caninas implicadas

Las razas en las que se ha descrito la mutación *MDR1-1Δ* pertenecen en su mayoría al grupo de perros pastores (Collie, Border Collie, Pastor Australiano, Shetland Sheep Dog, Pastor Inglés, Pastor Blanco Suizo, McNab, entre otros) y lebreles (Whippet de pelo largo, Silken Windhounds) (Geyer y col., 2005; Neff y col., 2004).

Se sugiere que el origen de la mutación ocurrió en una población ancestral de perros pastores que vivían en Gran Bretaña a mitad del 1800, antes de la emergencia de las razas (Neff y col., 2004).

### **Razas propuestas: Pastor Alemán y Doberman**

El *Pastor Alemán* proviene de Alemania y su origen se remonta a 1899. Forman parte del grupo de perros pastores debido a que fueron desarrollados originalmente para reunir y vigilar ovejas. Por su fuerza, inteligencia, capacidad de entrenamiento, obediencia; son utilizados como perro guardián, guía de ciegos, animal de salvamento y perro policía.

Maximilian von Stephanitz, capitán de caballería del ejército alemán, es considerado el padre de la raza. Más tarde, tras la aparición de la Asociación de Amigos del Pastor Alemán en 1899, se inició una selección de ejemplares cuyos cruces mejoraron tanto el aspecto psíquico como físico del animal.

El primer ejemplar inscripto *Horand von Grafath*, fue un animal vigoroso, de firme carácter, pelaje grisáceo y aspecto lobuno, rasgos que Von Stephanitz buscaba ([http://es.wikipedia.org/wiki/Pastor\\_aleman](http://es.wikipedia.org/wiki/Pastor_aleman)). Su abuelo, *Greif* nacido en el año 1879 era un perro pastor todo blanco.

Muchos de los hijos de Horand von Grafrath nacieron blancos (<http://www.pastorblancosuizo.net/inicio.php?page=raza>).

El estándar racial en 1930 consideraba el pelaje blanco como un defecto eliminatorio. Posteriormente en la década del 60 las autoridades caninas alemanas comenzaron una campaña contra el Pastor Alemán blanco que casi lleva su desaparición en Europa.

La misma medida se tomó en Estados Unidos pero luego se creó el Club del Pastor Alemán blanco para defender la raza. En la década del 70 se reintrodujo en Europa, siendo en Suiza donde comenzó su expansión hasta que se reconoció como una nueva raza en 1991 con el nombre de *Pastor Blanco Suizo* (Morris D. 2001).

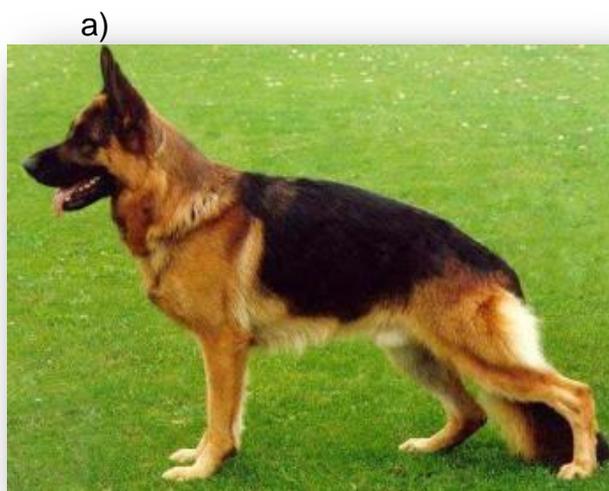


Foto 1. a) Pastor Alemán,  
<http://pastor-aleman.reymascotas.com>



b) Pastor Blanco Suizo  
<http://elpastorblanco.blogspot.com>

El *Doberman* fue creado a fines del siglo XIX por Louis Dobermann, un recaudador de impuestos Alemán.

En 1870 realizó una serie de cruzamientos para conseguir un perro con la agresividad suficiente para protegerlo en su trabajo. Como también estaba a cargo de un refugio de perros tuvo acceso a una gran variedad de razas que utilizó, entre las que se incluyen el Pinscher, Boyero de Montaña Bernés, Manchester terrier, Galgo, Pastor de Beauce, Rottweiler, Pointer, Weimaraner (Morris D, 2001) (<http://www.es.wikipedia.org/wiki/Doberman>).

En 1899 la raza estaba estabilizada y al año siguiente fue reconocida oficialmente por la sociedad canina alemana.

a)



Foto 2. a) Doberman marrón

<http://www.petwave.com/Dogs/Breeds/Doberman-Pinscher.aspx>

b)



b) Doberman negro

<http://www.es.wikipedia.org/wiki/Doberman>

En el origen estas razas participaron perros pastores y lebreles, en los que se ha encontrado sensibilidad a la ivermectina, lo cual motivó el estudio de *MDR1-1Δ* en el Pastor Alemán y Doberman.

Particularmente en el Pastor Alemán hay una vinculación genética con el Pastor Blanco Suizo en el que se detectó la mutación en una alta frecuencia (Geyer y col., 2007; Gramer y col., 2011). Por otra parte en Doberman, aún no se ha descrito la mutación, pero si se han observado casos de neurotoxicidad por dicha droga (Hopkins y col., 1990; Bissonnette y col., 2008).

## Antecedentes

Los primeros casos de intoxicación por ivermectina en caninos se describieron en la década de los 80 en la raza Collie, en los que con dosis recomendadas se desencadenaban signos de neurotoxicidad. Motivo por el cual se comenzaron estudios en caninos de raza Beagle administrándoles diferentes dosis de ivermectina y evaluando la evolución de los signos post administración; concluyendo que la DL50 para esa raza era de 80mg/kg. También se estudiaron 4 grupos de Collies clasificados según la dosis administrada (control, grupo 1: 50ug/kg a 0,1%, grupo 2: 200ug/kg a 0,3% y grupo 3: 600ug/kg a 0,3%). En la necropsia de los perros que mostraron sensibilidad a dosis de 600ug/kg, la concentración de ivermectina en el cerebro fue significativamente alta lo cual indica la gran penetración de esta droga a través de la barrera hematoencefálica (Pulliam y col., 1985).

En los años 90 se realizaban investigaciones con ratones portadores de una mutación genética (*MDR1-1Δ*) que les hacía resistentes a muchos medicamentos (Schinkel y col., 1996). Considerando que el gen normal codifica para la Gp-P, se vio que comparados con ratones con genotipo silvestre, los mutantes mostraban alteraciones en la permeabilidad del SNC, absorción oral aumentada, excreción urinaria y biliar alterada para algunos medicamentos que son sustrato de Gp-P. Se pensó que esta mutación causaría problemas importantes para la vida del animal pero se concluyó que la presencia de la misma no interfería en las funciones básicas ya que estos animales eran saludables, fértiles y no presentaban anomalías anatómicas ni fisiológicas. Estos ratones permanecieron en el laboratorio hasta que un incidente casual despertó el interés de otros investigadores, ya que una infestación de ácaros llevó a la fumigación con ivermectina en spray que causó la muerte de los ratones que presentaban la mutación en el gen *MDR1*. Se demostró que éstos presentaban altas concentraciones de ivermectina en el cerebro a diferencia de los ratones con genotipo silvestre que se encontraban sanos (Dowling, 2006). En aquel momento ya se conocía la sensibilidad de los Collies a la ivermectina, esto llevó a relacionarlo con la muerte de los ratones que presentaban la mutación, siendo estudiado por la Dra. Mealey en el año 2001 quien demostró que existía una mutación por delección de 4pb en el gen *MDR1* (*MDR1-1Δ*) que estaba presente en los Collies sensibles a la droga mencionada.

Posteriormente otro grupo de investigadores comenzaron con el desarrollo de una herramienta de diagnóstico para detectar la mutación y predecir el fenotipo sensible a la droga mediante la técnica de PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa) utilizando ADN extraído de tejidos de intestino y células bucales lo cual no logró buenos resultados ya que se presume que estas muestras posiblemente tenían contaminación bacteriana (Roulet y col., 2003). Sin embargo otros investigadores obtuvieron buenos resultados al realizar la extracción de ADN a partir de células bucales (Neff y col., 2004).

La técnica se terminó de estandarizar cuando en otros trabajos se extrajeron muestras de ADN a partir de sangre entera y se obtuvieron como resultado del PCR dos tipos de bandas, una de 134pb que corresponde al alelo mutante y otra de 138pb del alelo salvaje (normal). Esto es relevante ya que permitió determinar el genotipo homocigoto  $+/+$  (normal), homocigoto  $-/-$  (mutante) y heterocigoto  $+/-$  (Geyer y col., 2005).

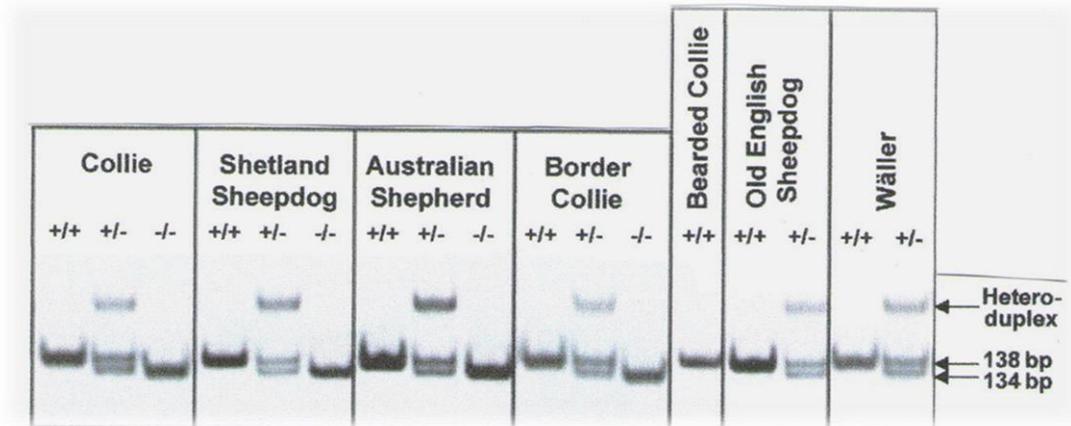


Figura 3. Electroforesis en gel de poliacrilamida identificando los tipos de bandas según genotipo (extraído de Geyer y col., 2005).

De aquí en adelante comenzaron varios estudios en diferentes lugares con el fin de identificar la presencia de la mutación en razas puras de perros, en cruza y en perros que habían presentado previamente signos de neurotoxicidad a diferentes drogas (ivermectina, doramectina, moxidectin, milbemicina oxima, vincristina y vinblastina) (Tappin y col., 2012; Gramer y col., 2011; Bissonnette y col., 2008; Mealey y col., 2008; Geyer y col., 2007, 2005 a y b; Neff y col., 2004). En Anexos 1 y 2 se detallan los resultados de estos investigadores presentados por Gramer y col., 2011.

De estas investigaciones destacamos los resultados obtenidos en la raza Pastor Blanco Suizo, que ha presentado una frecuencia alélica alta para la mutación y ha mostrado signos de neurotoxicidad a la doramectina (Geyer y col., 2007). Sin embargo en el Pastor Alemán quien esta genéticamente relacionado al anterior no se ha encontrado esta mutación. En Anexo 2 se muestran los resultados obtenidos en el trabajo citado previamente.

Otros autores han realizado reportes de neurotoxicidad a fármacos en muchos perros de diferentes razas y mestizos (sin raza definida) en los que algunos se ha encontrado la mutación y en otros no (Merola y col., 2009; Hopkins y col., 1990).

Cuadro 1. Reportes de intoxicación con Ivermectina en perros de razas no consideradas con *MDR1-1Δ*, datos extraídos de ASPCA\* (Merola y col., 2009).

<b>Raza</b>	<b>N° perros</b>
Coonhound	3
Shih tzu	3
Beagle	4
Jack Russell terrier	5
Dachshund	5
Chihuahua	6
Pit bull terrier	6
Greyhound	7
Labrador retriever	8
Pastor Alemán	23
Sin raza definida	47

\* ASPCA= Sociedad Americana para la Prevención de la Crueldad con los Animales.

En nuestro país, en el Área Genética de la Facultad de Veterinaria, UdelaR se comenzaron los estudios en este tema en caninos de las razas Cimarrón (n=36), Collie (n=4) y un ejemplar de las razas Caniche, Dálmata y Pug Carlino. Los resultados obtenidos mostraron la presencia de *MDR1-1Δ* solamente en la raza Collie (Gagliardi, 2009). Posteriormente en el mismo lugar se continuó el estudio en una muestra de caninos de las razas Border Collie y Galgo, en ambas el resultado fue negativo para la mutación mencionada (Sitjar, 2013).

## OBJETIVOS

### **Objetivo general:**

Adquirir conocimientos sobre el desarrollo de un trabajo experimental, la metodología de laboratorio, búsqueda bibliográfica y evaluación de resultados que contribuyan a nuestra formación académica.

Aportar información a la Clínica Veterinaria en el uso de los fármacos que son sustrato de la Glicoproteína P en perros de las razas Pastor Alemán y Doberman.

### **Objetivos específicos:**

Ampliar el Banco de ADN canino del Área Genética de Facultad de Veterinaria, UdelaR con muestras de animales de las razas Pastor Alemán y Doberman.

Estudiar si existe la mutación *MDR1-1Δ* en una muestra de perros de raza Pastor Alemán y Doberman de nuestro país.

En caso de presentarse dicha mutación, analizar su frecuencia alélica en ambas razas.

## HIPÓTESIS

Preguntas que busca responder en el plan de trabajo:

- ¿Se encuentra esta mutación en las razas Pastor Alemán y Doberman en nuestro país?
- Y si es así, ¿Con qué frecuencia se encuentra?

## MATERIALES Y MÉTODOS

### ❖ Población muestreada

Se muestrearon al azar un total de 65 caninos, de los cuales 34 pertenecen a la raza Pastor Alemán y 31 a la raza Doberman. Estas muestras están compuestas por animales con un rango de edad amplio (promedio de 5 años) y de ambos sexos.

El lugar de origen de los animales son localidades de los departamentos de Canelones (Las Piedras, La Paz, Tala, San Ramón y Canelones), Montevideo (Pajas Blancas y Montevideo), Lavalleja (Minas y Villa del Rosario), Maldonado (Punta Del Este) y Florida (Cardal). En Anexos 3 y 4 se detalla la información de cada animal.

De estos animales, 21 entre ambas razas han recibido alguna vez tratamiento Lactonas Macrocíclicas (LMC), pero ninguno presentó reacciones adversas luego de su administración.

Estos datos fueron extraídos al momento de la toma de muestra mediante una encuesta que se realizó a sus dueños o veterinario tratante, la cual también incluye los datos de reseña (Ficha de Identificación).

Cuadro 2. Antecedentes de tratamientos y reacciones adversas (RA) a LMC

	<b>P. Alemán</b>	<b>Doberman</b>
<b>Trat. LMC</b>	7	15
<b>R A</b>	0	0
<b>Total de la muestra</b>	34	31

**TESIS DE GRADO:** Br. Diana Martínez / Br. Beatriz Tellechea  
Tutora : Dra. Rosa Gagliardi  
Área Genética. Facultad de Veterinaria  
Año 2012 - 2013

## **FICHA DE IDENTIFICACION**

Número de entrada al Laboratorio:

Fecha de extracción de la muestra:

Lugar:

Muestra obtenida: Sangre (con EDTA)

### **Datos del Animal**

- Nombre:
- Raza:
- Criadero/Padres:
- Edad:
- Sexo:
- ¿Ha sido tratado con lactonas macróciclicas?  
Si                      No
- ¿Cual de ellas?  
Ivermectina / Doramectina / Selamectina / Milbemicina
- ¿Luego de su administración se observaron síntomas de neurotoxicidad?

### **Datos del propietario:**

- Nombre
- Teléfono/ Celular
- Dirección
- Ciudad
- Correo electrónico

Figura 4. Ficha de Identificación

### ❖ **Toma de muestras**

Se extrajeron 2ml de sangre de cada animal para extracción de ADN y su análisis. En el mismo momento se realizó la ficha mencionada de cada animal.

Cada muestra se denominó con la letra D para el caso de los Doberman y OA en el caso de los Pastor Alemán, siguiéndole el número correlativo de llegada al laboratorio, ejemplo D1, D2, OA1, OA2, etc.

La extracción de sangre se realizó en una clínica veterinaria o en el domicilio, en presencia del dueño y en condiciones de mínimo estrés para el animal. Se trata de un procedimiento que insume pocos minutos y no necesita la administración de ningún fármaco de tipo sedante ni otro, solo basta con la contención de su dueño.

Previamente se rasuró, se desinfectó la región del antebrazo desde donde se extrajo sangre de la vena radial utilizando jeringa estéril y aguja o mariposa 21 /23G. La sangre se depositó en tubos que contienen K3 EDTA como anticoagulante y se mantuvo refrigerada o congelada hasta su procesamiento.

### ❖ **Extracción de ADN genómico a partir de sangre entera**

La técnica empleada fue estandarizada en el Área Genética de Facultad de Veterinaria, UdelaR.

#### **Paso 1: Primera Lisis**

Invertir suavemente la muestra de sangre, controlando que no tenga coágulos.

Colocar la muestra de sangre (1ml aproximadamente) en tubos Falcon de 50ml rotulados.

Agregar 2ml de Solución de Lisis de Glóbulos Rojos 1X (SLGR) (relación 1:2) mezclar sin invertir y lisar por 5 minutos a temperatura ambiente (el color se oscurece marcadamente).

Centrifugar (sin tapar) a 2500 rpm por 10 minutos.

Descartar el sobrenadante.

#### **Paso 2: Segunda Lisis**

Agregar 1ml de SLGR 1X, tapar con las tapas correspondientes y agitar suavemente para disgregar el pellet.

Controlar que no haya coágulos, en caso de haber alguno, "pescarlo" con un pipeta Pasteur de plástico y descartarlo.

Centrifugar (sin tapar) a 2500 rpm por 10 min.

Descartar el sobrenadante e invertir los tubos sobre papel para quitar el exceso de líquido del pellet.

#### **Paso 3: Lavado**

Agregar 1 ml de TBS 1X. Tapar y agitar suavemente para disgregar el pellet.

Centrifugar (sin tapar) a 2500 rpm por 10 minutos.

Descartar el sobrenadante e invertir los tubos sobre papel para quitar el exceso de líquido del pellet.

El pellet debe quedar blanco.

Si el pellet continua sucio, agregar 1ml de TBS 1X. Tapar y agitar suavemente para disgregar el pellet.

Centrifugar (sin tapar) a 2500 rpm por 5 minutos.

#### **Paso 4: Digestión**

Agregar 300ul de TE 1X (frío). Vortexear hasta que el pellet se resuspenda (si es necesario, disgregarlo con micropipeta p1000).

Debe quedar bien disgregado, de lo contrario no se digeirá correctamente en la incubación.

Agregar 300ul de solución Proteinasa K (PK 1X) traslúcida. Antes de usar la solución PK1X, se debe calentar el volumen total a usar en baño María a no más de 20°C para disolver el SDS ( queda totalmente disuelto cuando la solución se vuelve transparente).

Tapar y agitar suavemente sin invertir.

Digerir a 50°C en baño de agua o estufa, durante toda la noche (overnight).

#### **Paso 5**

Añadir 300ul de solución Acetato de Potasio (3M) para la digestión e invertir para que se mezcle.

Incubar a -20°C por 10 minutos.

Centrifugar a 14000 rpm por 10 minutos.

#### **Paso 6: Precipitación**

Transferir el sobrenadante a un nuevo tubo.

Añadir 500ul de isopropanol y mezclar para que precipite el ADN.

Incubar a -20°C por 10 minutos ( lo que maximiza la precipitación del ADN )

Centrifugar a 14000rpm por 15 minutos.

#### **Paso 7: Lavado**

Retirar el sobrenadante y agregar 600ul de etanol (70%) para lavar el pellet.

Centrifugar por 10 minutos a alta velocidad.

#### **Paso 8: Dilución en buffer**

Vertir cuidadosamente el etanol y secar al aire el precipitado en una campana durante 5 a 10 minutos.

Resuspender el ADN precipitado en 100ul de TE (Tris, EDTA).

Dejar diluir por una semana a temperatura ambiente.

Conservar las muestras en freezer a -20°C.

#### **❖ Medida de la concentración de ADN (cuantificación)**

Se utilizó el Nanodrop, ND-1000 espectrofotómetro, perteneciente al Laboratorio de Técnicas Nucleares de la Facultad de Veterinaria, el cual mide la absorbancia de todas las moléculas de la muestra (ADN, ARN, proteínas etc.).



Foto 3. Nanodrop ND-1000 (Foto propia)

Preparación de la muestra para medir: Se descongelan las muestras y se resuspenden en vortex durante 20 segundos.

Para realizar la medición se colocan 2ul del ADN a medir en el equipo, empleando el programa informático ND-1000 donde se selecciona la medida de ácidos nucleicos y se considera:

- concentración de ADN (ng/ul)
- relación 260/280: evalúa la pureza del ADN que se absorbe a 260nm mientras que otros contaminantes como proteínas, lo hacen a 280nm.
- relación 260/230: otros contaminantes, es una medida secundaria de la pureza del ADN.

Para genotipar se recomienda que las muestras de ADN tengan una concentración mínima de 50ng/ul, valores de 1,8 para la relación 260/280 y 2,0 para 260/230 (el ADN se considera puro)

(<http://www.nanodrop.com/Library/T042-NanoDrop-Spectrophotometer-Nucleic-Acid-Purity-Ratios.pdf>).

#### ❖ Genotipado

Para conocer el genotipo de *MDR1* de las muestras extraídas se envió al laboratorio *Gene Seek, Neogen Corporation* de Chicago, Estados Unidos.

## RESULTADOS y DISCUSIÓN

### ✦ Cuantificación de ADN

Los resultados de Nanodrop mostraron valores aceptables de concentración y pureza los que se presentan en los Anexos 5 y 6. De las 65 muestras, aproximadamente un 18% presentó más de un parámetro alejado del ideal. A pesar de esto, todas fueron enviadas porque el laboratorio que las recibe cuenta con medios para purificarlas.

### ✦ Resultados de Gene Seek

Los resultados recibidos del *Gene Seek*, *Neogen Corporation*, indican que no fue encontrada la mutación *MDR1-1Δ* en ninguna de las muestras de ADN procesadas.

Sample ID	mdr1-1	mdr1-2	Sample ID	mdr1-1	mdr1-2
1					
2	D 10	AGAT	AGAT	OA 10	AGAT
3	D 11	AGAT	AGAT	OA 11	AGAT
4	D 12	AGAT	AGAT	OA 12	AGAT
5	D 13	AGAT	AGAT	OA 13	AGAT
6	D 14R	AGAT	AGAT	OA 14R	AGAT
7	D 15	AGAT	AGAT	OA 15	AGAT
8	D 16R	AGAT	AGAT	OA 16	AGAT
9	D 17	AGAT	AGAT	OA 17	AGAT
10	D 18	AGAT	AGAT	OA 18	AGAT
11	D 19	AGAT	AGAT	OA 19	AGAT
12	D 20	AGAT	AGAT	OA 20	AGAT
13	D 21	AGAT	AGAT	OA 21R	AGAT
14	D 22	AGAT	AGAT	OA 22	AGAT
15	D 23	AGAT	AGAT	OA 23	AGAT
16	D 24R	AGAT	AGAT	OA 24	AGAT
17	D 25R	AGAT	AGAT	OA 25	AGAT
18	D 26R	AGAT	AGAT	OA 26	AGAT
19	D 27			OA 27	AGAT
20	D 28R	AGAT	AGAT	OA 28	AGAT
21	D 29	AGAT	AGAT	OA 29	AGAT
22	D 3	AGAT	AGAT	OA 3	
23	D 30	AGAT	AGAT	OA 30	AGAT
24	D 31	AGAT	AGAT	OA 31	AGAT
25	D 4R	AGAT	AGAT	OA 32	AGAT
26	D 5R	AGAT	AGAT	OA 33	AGAT
27	D 6	AGAT	AGAT	OA 34	AGAT
28	D 7	AGAT	AGAT	OA 9	AGAT
29	D 8	AGAT	AGAT		
30	D 9	AGAT	AGAT		

Figura 5. Resultados de Genotipado

Del total de las muestras, sólo una de cada raza (OA3 y D27) no pudieron ser genotipadas. Cabe destacar que sus valores (concentración de ADN y relación 260/280) reunían las condiciones para su envío, por lo cual se desconoce la razón de que no hayan podido ser analizadas.

Si ellas correspondieran a animales de un interés particular, como por ejemplo que hayan presentado reacciones adversas a algún fármaco, se debe repetir la muestra y volver a enviarla. En este caso, se trata de un estudio para conocer la situación del *MDR1-1Δ* en las razas estudiadas, por lo cual no amerita repetir las.

En estudios realizados previamente en Europa se ha descrito la mutación en la raza Pastor Blanco Suizo quien está genéticamente relacionado con el Pastor Alemán pero son considerados dos razas distintas (Gramer y col., 2011; Geyer y col., 2007). Sin embargo, en Estados Unidos se ha encontrado *MDR1-1Δ* en Pastor Alemán de pelaje blanco, los cuales en éste país son una variante de color dentro de esta raza (Mealey y col., 2008; Neff y col., 2004).

Dados los antecedentes donde aparece la mutación con una alta frecuencia alélica en Pastor Blanco Suizo es relevante continuar con el análisis en Pastor Alemán dada con su relación con el anterior (Gramer y col., 2011; Geyer y col., 2007).

Sumado a lo anterior y teniendo en cuenta la gran densidad de ejemplares de Pastor Alemán presentes en Uruguay sería oportuno ampliar el número de muestras incluyendo animales de otras regiones del país ya que este estudio se realizó con 34 animales todos procedentes del sureste.

En lo que se refiere al Doberman, se han comunicado 3 casos de neurotoxicidad por ivermectina, en uno de ellos el animal ingirió accidentalmente una cantidad excesiva de este fármaco, como en ese momento se desconocía la existencia de la mutación *MDR1-1Δ* no se le realizó estudios genéticos (Hopkins y col., 1990).

El segundo caso se trató de 2 animales con demodicosis que recibieron tratamiento con ivermectina y presentaron neurotoxicidad, estos fueron genotipados siendo ambos homocigotos normales para el gen *MDR1* (Bissonnette y col., 2008). No se han encontrado otros estudios en la raza Doberman con respecto a la existencia de la mutación.

Pese a que el tamaño de la muestra de cada raza se considera adecuado (34 Pastor Alemán y 31 Doberman), sería interesante aumentarlo y ampliar el muestreo con animales procedentes de otras zonas del país, ya que existen trabajos previos en otras razas en los que se describió la presencia de la mutación en frecuencia muy baja (Neff y col., 2004).

De acuerdo a esto, la sensibilidad a fármacos podría deberse también a mutaciones aun no identificadas en otras regiones de ese gen, o en otros genes que intervengan en el transporte/metabolismo de drogas de la misma subfamilia u otra, o en enzimas que participan en el metabolismo de las drogas (ej. Citocromo P450) (Bissonnette y col., 2008; Neff y col., 2004).

Según nuestros resultados y todo lo discutido anteriormente, no descartamos la posibilidad de que perros de estas razas manifiesten reacciones adversas luego de administrarles algún fármaco sustrato de la Gp-P, recordando que esto puede ser debido a:

- ✓ mutaciones en otra/s región/es del gen *MDR1* aún no identificada/s.
- ✓ mutaciones en otros genes, que afecten otras proteínas de transporte o de metabolismo.
- ✓ uso combinado de varios fármacos .
- ✓ variaciones individuales de los animales (estado de nutrición, salud, genética, etc.).

## CONCLUSIONES

- No se detectó la mutación del gen *MDR1*(*MDR1-1Δ* ) asociada a sensibilidad a fármacos en ningunos de los animales estudiados.
- Estos resultados no son suficientes para descartar la presencia de *MDR1-1Δ* en estas razas.
- Es posible que la frecuencia alélica sea muy baja y con el número de muestra utilizado quizás no alcance para detectarla.
- Por último queremos insistir que al realizar un tratamiento farmacológico es necesario tener conocimiento del fármaco a usar, combinaciones de ellos, edad, estado fisiológico y de salud del animal, con el fin de obtener los mejores resultados y minimizar los riesgos para el paciente.

## BIBLIOGRAFÍA

- 1) Bissonnette S, Paradis M, Daneau I, Silverside DW (2008). The *ABCB1-1Δ* mutation is not responsible for subchronic neurotoxicity seen in dogs of non-collie breeds following macrocyclic lactone treatment for generalized demodicosis. *Vet Dermatol* 20(1):60-66.
- 2) Dean M, Rzhetsky A, Allikmets R (2001). The Human ATP-Binding Cassette (ABC) Transporter Superfamily. *Gen Res* 11:1156-1166.
- 3) Dowling P (2006). Pharmacogenetics: It's not just about ivermectina in collies. *Pharmacol Update* 47:1165-1168.
- 4) Fromm M (2004). Importance of P-glycoprotein at blood-tissue barriers. *Trends Pharmacol Sci* 25(8):423-429.
- 5) Gagliardi R (2009). Estudios genéticos en caninos de raza Cimarrón Uruguayo (*Canis familiaris*). Tesis Facultad de Veterinaria, Universidad de la República, 78p.
- 6) Geyer J, Döring B, Godoy JR, Moritz A, Petzinger E (2005). Development of a PCR-based diagnostic test detecting a nt230 (del4) *MDR1* mutation in dogs: verification in a moxidectin-sensitive Australian Shepherd. *J Vet Pharmacol Therap* 28:95-99.
- 7) Geyer J, Döring B, Godoy JR, Leidolf R, Moritz A, Petzinger E (2005). Frequency of the nt230 (del4) *MDR1* mutation in Collies and related dog breeds in Germany. *J Vet Pharmacol Therap* 28:545-551.
- 8) Geyer J, Klintzsch S, Meerkamp K, Wöhlke A, Distl O, Moritz A, Petzinger E (2007). Detection of the nt230 (del4) *MDR1* mutation in White Swiss Shepherd dogs: case reports of doramectin toxicosis, breed predisposition, and microsatellite analysis. *J Vet Pharmacol Therap* 30:482-485.
- 9) Geyer J, Janko C (2012). Treatment of *MDR1* Mutant Dogs with Macrocyclic Lactones. *Curr Pharm Biotechnol* 13(6):969-986.
- 10) Gramer I, Leidolf R, , Döring B, Klintzsch S, Krämer E-M, Yalcin E, Petzinger E, Geyer J (2011). Breed distribution of the nt230 (del4) *MDR1* mutation in dogs. *Vet J* 189:67-71.
- 11) "Historia del Pastor Blanco". Disponible en: <http://www.pastorblancosuizo.net/inicio.php?page=raza>. Fecha de consulta: setiembre de 2013
- 12) Hopkins KD, Marcella KL, Strecker AE (1990). Ivermectin toxicosis in a dog. *J Am Vet Med Assoc* 197:93-94.
- 13) Mealey KL, Bentjen SA, Gay JM, Canthor GH (2001). Ivermectin sensitivity in collies is associated with a deletion mutation of the *MDR1* gene. *Pharmacogenetics* 11:727-733.
- 14) Mealey KL, Northrup NC, Bentjen SA (2003). Increased toxicity of P-glycoprotein-substrate chemotherapeutic agents in a dog with the *MDR1* deletion mutation associated with ivermectina sensitivity. *J Am Vet Med Assoc* 223:1453-1455.
- 15) Mealey KL (2004). Therapeutic implication of the MDR-1 gene. *J Vet Pharmacol Therap* 27:257-264.
- 16) Mealey KL (2006). Farmacogenética. *Clin Vet NA Med Peq Anim* 36:961-973.
- 17) Mealey KL, Meurs KM (2008). Breed distribution of the *ABCB1-1Δ* (multidrug sensitivity) polymorphism among dogs undergoing *ABCB1* genotyping. *J Am Vet Med Assoc* 233:921-924.
- 18) Merola V, Khan S, Gwaltney-Brant S (2009). Ivermectin Toxicosis in Dogs: A Restrospective Study. *J Am Anim Hosp Assoc* 45:106-111.

- 19) Morris D (2001). Razas de Perros, Barcelona, Omega, 765p.
- 20) Neff MW, Robertson KR, Wong AK, Safra N, Broman KW, Slatkin M, Mealey KL, Pedersen NC (2004). Breed distribution and history of canine *MDR1-1Δ* a pharmacogenetic mutation that marks the emergence of breed from the collie lineage. *Proc Nat Acad Sci* 101:11725-11730.
- 21) Peláez de Lucas, M. "La sensibilidad de los collies a los medicamentos y el gen *MDR1*". Disponible en: <http://www.elcollie.es/archivos/collies-medicamentos>. Fecha de consulta: setiembre de 2012.
- 22) Pulliam JD, Henry RT, Steinberg SA (1985). Investigating ivermectin toxicity in Collies. *Vet Med* 80:33-40.
- 23) Roulet A, Puel O, Gesta S, Lepage J-F, Drag M, Soll M, Alvinerie M, Pineau T (2003). *MDR1*-deficient genotype in Collie dog hypersensitive to the P-glycoprotein substrate ivermectin. *European J of Pharmacol* 460:85-91.
- 24) Schinckel AH, Wagenaar E, Mol C, Deemter L (1996). P-Glycoprotein in the Blood-Brain Barrier of Mice Influences the Brain Penetration and Pharmacological Activity on Many Drugs. *J Clin Invest* 97:2517-2524.
- 25) Sitjar P (2013). Análisis de la mutación del gen *MDR1* (gen de resistencia a múltiples drogas) en las razas Galgo y Border Collie en Uruguay. Tesis Facultad de Veterinaria, Universidad de la República, 48p.
- 26) T009-Technical Bulletin Nanodrop 1000&8000. "260/280 and 260/230 Ratios. Disponible en: <http://www.nanodrop.com/Library/T042-NanoDrop-Spectrophotometer-Nucleic-Acid-Purity-Ratios.pdf>. Fecha de consulta: setiembre de 2013.
- 27) Tappin SW, Goodfellow MR, Peters IR, Day MJ, Hall EJ, Mealey KL (2012). Frequency of the mutant *MDR1* allele in dogs in the UK. *Vet Rec* 171:72.
- 28) Wikipedia La Enciclopedia Libre. "Doberman". Disponible en: <http://www.es.wikipedia.org/wiki/Doberman>. Fecha de consulta: setiembre de 2013.
- 29) Wikipedia La Enciclopedia Libre. "Pastor Alemán". Disponible en : [http://www.es.wikipedia.org/wiki/Pastor\\_aleman](http://www.es.wikipedia.org/wiki/Pastor_aleman). Fecha de consulta: setiembre de 2013.

**Anexo 1.** Frecuencia de los genotipos de *MDR1* según estudios de genotipificación en todo el mundo (datos extraídos de Gramer y col., 2011).

		EEUU <sup>a</sup>	EEUU <sup>b</sup>	Alemania <sup>a</sup>	Reino Unido <sup>a</sup>	Francia
<b>Collie</b> 	<b>MDR1% (+/+)</b>	22.6	26	23.9	7.1	20
	<b>(+/-)</b>	42	46	43.1	40.5	32
	<b>(-/-)</b>	35.4	28	33	52.4	48
	<b>n</b>	1424	161	578	42	25
	<b>AF %</b>	56	51	55	73	64
<b>Shetland sheepdog</b> 	<b>MDR1% (+/+)</b>	88.2	84.2	45.7	40.8	
	<b>(+/-)</b>	10.5	14.7	48.6	47.8	
	<b>(-/-)</b>	1.3	1.1	5.7	12.2	
	<b>n</b>	448	190	140	49	
	<b>AF %</b>	7	8	30	36	
<b>Pastor australiano</b> 	<b>MDR1% (+/+)</b>	53	68.5	67.9	32.1	
	<b>(+/-)</b>	37	29.8	25.2	42.9	
	<b>(-/-)</b>	10	1.7	6.9	25	
	<b>n</b>	1421	178	333	28	
	<b>AF%</b>	29	17	20	46	

Referencias: *MDR1*% (+/+), (+/-) y (-/-) : porcentaje de homocigoto normal, heterocigoto y homocigoto mutante respectivamente, *n* : número de perros analizados; *AF* : frecuencia alélica de *MDR1-1Δ*.

Fuente de las fotos:

<http://thelife-animal.blogspot.com/2012/08/collie.html>

<http://amigosdelcollie.foroespana.com/t2-pastor-de-shetland-shetland-sheepdog>

<http://pastor-australiano.blogspot.com/2009/02/arreglo-del-pastor-australiano.html>

**Anexo 1.** Frecuencia de los genotipos de *MDR1* según estudios de genotipificación en todo el mundo (datos extraídos de Gramer y col., 2011) (*continuación*).

		Japón	Alemania <sup>b</sup>	Reino Unido <sup>b</sup>	EEUU <sup>c</sup>	Australia
<b>Collie</b> 	<b>MDR1% (+/+)</b>	25	50	14.9	22.5	12.1
	<b>(+/-)</b>	33.3	50	51.1	42.5	63.6
	<b>(-/-)</b>	41.7	0	34	35	24.3
	<b>n</b>	12	14	94	40	33
	<b>AF %</b>	58	25	60	56	56
<b>Shetland Sheepdog</b> 	<b>MDR1% (+/+)</b>	97.6	33.3			57.1
	<b>(+/-)</b>	2.4	0			42.9
	<b>(-/-)</b>	0	66.7			0
	<b>n</b>	42	3			7
	<b>AF%</b>	1	67			21
<b>Pastor australiano</b> 	<b>MDR1% (+/+)</b>	44.4	33.3			35.7
	<b>(+/-)</b>	44.4	66.7			42.8
	<b>(-/-)</b>	11.2	0			21.5
	<b>n</b>	9	3			14
	<b>AF%</b>	33	33			43

Referencia: *MDR1*% (+/+), (+/-) y (-/-) : porcentaje de homocigoto normal, heterocigoto y homocigoto mutante respectivamente, *n* : número de perros analizados; *AF* : frecuencia alélica de *MDR1-1Δ*.

Fuente de las fotos:

<http://thelife-animal.blogspot.com/2012/08/collie.html>

<http://amigosdelcollie.foroespana.com/t2-pastor-de-shetland-shetland-sheepdog>

<http://pastor-australiano.blogspot.com/2009/02/arreglo-del-pastor-australiano.html>

**Anexo 1.** Frecuencia de los genotipos de *MDR1* según estudios de genotipificación en todo el mundo (extraído de Gramer y col., 2011) (*continuación*).

		EEUU <sup>a</sup>	EEUU <sup>b</sup>	Alemania <sup>a</sup>	Reino Unido <sup>a</sup>	Alemania <sup>b</sup>
<b>Border Collie</b> 	<b>MDR1 % (+/+)</b>	98.4	100	99.1	95.3	87.5
	<b>(+/-)</b>	1.3	0	0.6	4.7	12.5
	<b>(-/-)</b>	0.3	0	0.3	0	0
	<b>n</b>	306	222	334	43	8
	<b>AF%</b>	1	0	1	2	6
<b>Viejo pastor inglés</b> 	<b>MDR1 % (+/+)</b>	97.5	92.7	87.5	78.8	
	<b>(+/-)</b>	2.5	7.3	12.5	7.2	
	<b>n</b>	40	151	24	33	
	<b>AF %</b>	1	4	6	11	
<b>Pastor australiano miniatura</b> 	<b>MDR1 % (+/-)</b>	63.1	51.8			
	<b>(+/-)</b>	33.7	44.6			
	<b>(-/-)</b>	3.2	3.6			
	<b>n</b>	285	56			
	<b>AF</b>	20	26			

Referencia: *MDR1*% (+/+), (+/-) y (-/-) : porcentaje de homocigoto normal, heterocigoto y homocigoto mutante respectivamente, *n* : número de perros analizados; *AF* : frecuencia alélica de *MDR1-1Δ*.

Fuente de las fotos:

<http://www.perrosgatosymas.es/blog-de-mascotas/border-collie/>

<http://elblogdemaskota.wordpress.com/2013/05/21/caracteristicas-del-viejo-pastor-ingles-o-bobtail/>

[http://en.wikipedia.org/wiki/Miniature\\_Australian\\_Shepherd](http://en.wikipedia.org/wiki/Miniature_Australian_Shepherd)

**Anexo 1.** Frecuencia de los genotipos de *MDR1* según estudios de genotipificación en todo el mundo (extraído de Gramer y col., 2011) (*continuación*).

		EEUU <sup>a</sup>	EEUU <sup>b</sup>	Alemania <sup>a</sup>	Reino Unido <sup>a</sup>	Alemania <sup>b</sup>
<b>Whippet de pelo largo</b> 	<b>MDR1% (+/+)</b>	41.7	32.6			
	<b>(+/-)</b>	58.3	51.7			
	<b>(-/-)</b>	0	15.7			
	<b>n</b>	24	89			
	<b>AF %</b>	29	42			
<b>Mc Nab</b> 	<b>MDR1% (+/+)</b>		68.6			
	<b>(+/-)</b>		28.6			
	<b>(-/-)</b>		2.8			
	<b>n</b>		35			
	<b>AF %</b>		17			
<b>Silken windhound</b> 	<b>MDR1% (+/+)</b>	68.8	65.5			
	<b>(+/-)</b>	31.2	33.3			
	<b>(-/-)</b>	0	1.2			
	<b>n</b>	16	84			
	<b>AF%</b>	16	18			

Referencia: *MDR1*% (+/+), (+/-) y (-/-) : porcentaje de homocigoto normal, heterocigoto y homocigoto mutante respectivamente, *n* : número de perros analizados; *AF* : frecuencia alélica de *MDR1-1Δ*.

Fuente de las fotos:

<http://ukeleleswhippet.wordpress.com/2012/08/04/whippet-longhair/>

[http://www.cowboydogtrainer.com/cowboydogtrainer4\\_files/dogs\\_forsale/zeena.htm](http://www.cowboydogtrainer.com/cowboydogtrainer4_files/dogs_forsale/zeena.htm)

[http://en.wikipedia.org/wiki/File:Silken\\_Windhound\\_Nobble\\_Stack\\_F.jpg](http://en.wikipedia.org/wiki/File:Silken_Windhound_Nobble_Stack_F.jpg)

**Anexo 1.** Frecuencia de los genotipos de *MDR1* según estudios de genotipificación en todo el mundo (extraído de Gramer y col., 2011)(*continuación*).

		EEUU <sup>a</sup>	EEUU <sup>b</sup>	Alemania <sup>a</sup>	Reino Unido <sup>a</sup>	Alemania <sup>b</sup>
<b>Pastor Alemán</b> 	<b><i>MDR1</i>% (+/+)</b>	89.8	100			
	<b>(+/-)</b>	8.4	0			
	<b>(-/-)</b>	1.8	0			
	<b>n</b>	166	95			
	<b>AF %</b>	6	0			
<b>English shepherd</b> 	<b><i>MDR1</i>% (+/+)</b>	100	85.7			
	<b>(+/-)</b>	0	14.3			
	<b>n</b>	28	91			
	<b>AF %</b>	0	7			
<b>Wäller</b> 	<b><i>MDR1</i>% (+/+)</b>			62.9		
	<b>(+/-)</b>			37.1		
	<b>n</b>			62		
	<b>AF%</b>			19		

Referencias: *MDR1*% (+/+), (+/-) y (-/-) : porcentaje de homocigoto normal, heterocigoto y homocigoto mutante respectivamente, *n* : número de perros analizados; *AF* : frecuencia alélica de *MDR1-1Δ*.

Fuente de las fotos:

<http://www.perrosclub.com/es/razas-de-perros/pastor-aleman/estandar.php>

[http://www.dogster.com/dog-breeds/English\\_Shepherd](http://www.dogster.com/dog-breeds/English_Shepherd)

<http://waellerfreunde.de/boomer-de-la-ville-de-tours/>

**Anexo 2.** Frecuencia de los genotipos de *MDR1* en Pastor Blanco Suizo (extraído de Geyer y col., 2007).

		<b>Alemania</b>
	<b>Pastor Blanco Suizo</b>	
	<i>MDR1</i> % (+/+)	76,2
	(+/-)	21,5
	(-/-)	2,3
	<b>n</b>	219
	<b>AF %</b>	13

Referencias: *MDR1*% (+/+), (+/-) y (-/-) : porcentaje de homocigoto normal, heterocigoto y homocigoto mutante respectivamente, *n* : número de perros analizados; *AF* : frecuencia alélica de *MDR1-1Δ*.  
Fuente de las foto: [http://es.wikipedia.org/wiki/Pastor\\_blanco\\_suizo](http://es.wikipedia.org/wiki/Pastor_blanco_suizo)

**Anexo 3.** Datos de los caninos Pastor Alemán muestreados.

<b>Muestra</b>	<b>Sexo</b>	<b>Edad (años)</b>	<b>Lugar de Origen</b>
OA1	M	8	♦
OA2	M	2	♦
OA3	H	4	♠
OA4	H	6	♠
OA5	H	3	♠
OA6	H	6	♠
OA7	M	1	♠
OA8	M	1	♠
OA9	M	2	□
OA10	H	5	□
OA11	H	8	♦
OA12	M	7	■
OA13	M	10	♠
OA14	H	4	♠
OA15	M	1	●
OA16	H	<1	♠
OA17	M	1	♣

M: macho, H: hembra, <1:menor a 1 año  
♦ Minas, ♠ Las Piedras, □ Punta Del Este, ■ Montevideo  
● Canelones ♣ La Paz, ♥ Villa Del Rosario, ◇ Cardal,  
\* San Ramón.

**Anexo 3.** Datos de los caninos Pastor Alemán muestreados (*continuación*).

<b>Muestra</b>	<b>Sexo</b>	<b>Edad (años)</b>	<b>Lugar de Origen</b>
OA18	M	9	■
OA19	M	1	♣
OA20	H	2	♦
OA21	H	8	♥
OA22	H	2	♥
OA23	H	3	♠
OA24	H	1	♠
OA25	M	9	◇
OA26	H	5	♠
OA27	H	10	♠
OA28	M	<1	♠
OA29	M	1	♠
OA30	M	1	*
OA31	H	2	*
OA32	M	1	*
OA33	M	<1	*
OA34	H	<1	*

M: macho, H: hembra, <1: menor a 1 año,  
 ♦ Minas, ♠ Las Piedras, □ Punta Del Este, ■ Montevideo,  
 ● Canelones, ♣ La Paz, ♥ Villa Del Rosario, ◇ Cardal,  
 \* San Ramón.

**Anexo 4.** Datos de los caninos Doberman muestreados.

Muestra	Sexo	Edad (años)	Color	Lugar de Origen
D1	M	1	n	■
D2	M	8	n	♥
D3	H	13	m	◻
D4	H	7	m	■
D5	M	3	n	♠
D6	H	4	n	◻
D7	H	1	m	◻
D8	M	4	m	◻
D9	M	3	m	▲
D10	H	1	i	▲
D11	M	<1	n	▲
D12	M	5	n	▲
D13	M	3	n	▲
D14	H	2	m	♣
D15	M	2	n	♣

M:macho, H:hembra, <1:menor a 1 año n:negro, m:marrón, i:isabelino, ■ Montevideo, ♥ Villa Del Rosario, ◻ Pajas Blancas, ♠ Las Piedras, ▲ Tala, ♣ La Paz

**Anexo 4.** Datos de los caninos Doberman muestreados (*continuación*).

<b>Muestra</b>	<b>Sexo</b>	<b>Edad (años)</b>	<b>Color</b>	<b>Lugar de Origen</b>
D16	H	4	n	♣
D17	H	4	m	♣
D18	H	4	n	♣
D19	H	7	n	♣
D20	H	4	m	♣
D21	H	2	n	♣
D22	H	6	n	♣
D23	H	3	n	♣
D24	H	4	n	♠
D25	H	8	n	♠
D26	H	12	n	♠
D27	H	10	n	■
D28	H	9	n	■
D29	M	1	m	♠
D30	M	11	n	♠
D31	H	1	n	■

M: macho, H: hembra, <1: menor a 1 año,  
n:negro, m:marrón, ■ Montevideo, ♥ Villa Del Rosario,  
▣ Pajas Blancas, ♠ Las Piedras, ▲ Tala, ♣ La Paz

**Anexo 5.** Resultados de Nanodrop de las muestras de Pastor Alemán.

<b>Muestra</b>	<b>Concentración ng/ul</b>	<b>Relación</b>	
		<b>260/280</b>	<b>260/230</b>
<b>OA1</b>	324,5	1,84	1,92
<b>OA2</b>	419,7	1,81	1,54
<b>OA3</b>	126,3	1,59	0,47
<b>OA4</b>	175,4	1,89	1,91
<b>OA5</b>	107,9	1,88	1,82
<b>OA6</b>	345,2	1,73	1,28
<b>OA7</b>	225,2	1,85	1,91
<b>OA8</b>	264,4	1,86	2,26
<b>OA9</b>	139	1,88	1,60
<b>OA10</b>	158,8	1,92	1,57
<b>OA11</b>	248,8	1,85	1,75
<b>OA12</b>	331,5	1,84	1,56
<b>OA13</b>	249,1	1,88	2,27
<b>OA14</b>	50,4	1,73	1,34
<b>OA15</b>	51,9	2,02	1,58
<b>OA16</b>	100,1	1,81	1,53
<b>OA17</b>	271,4	1,87	1,63

**Anexo 5.** Resultados de Nanodrop de las muestras de Pastor Alemán (continuación).

<b>Muestra</b>	<b>Concentración ng/ul</b>	<b>Relación</b>	
		<b>260/280</b>	<b>260/230</b>
<b>OA18</b>	138,5	1,74	0,75
<b>OA19</b>	73,8	1,92	1,81
<b>OA20</b>	158,2	1,92	1,60
<b>OA21</b>	30,2	1,63	1,56
<b>OA22</b>	241,5	1,38	0,72
<b>OA23</b>	122,1	1,62	0,41
<b>OA24</b>	526,3	1,78	1,46
<b>OA25</b>	70,5	1,82	1,16
<b>OA26</b>	67,4	1,50	1,06
<b>OA27</b>	49,7	1,80	1,51
<b>OA28</b>	6,9	1,12	0,88
<b>OA29</b>	3,2	1,02	1,34
<b>OA30</b>	215,1	1,82	1,65
<b>OA31</b>	103,5	1,78	1,74
<b>OA32</b>	64,8	1,84	1,51
<b>OA33</b>	39,2	1,61	1,24
<b>OA34</b>	50,4	1,85	1,42

**Anexo 6 .** Resultados de Nanodrop de las muestras de Doberman.

---

<b>Muestra</b>	<b>Concentración ng/ul</b>	<b>Relación</b>	
		<b>260/280</b>	<b>260/230</b>
<b>D1</b>	409,1	1,81	1,80
<b>D2</b>	559,7	1,76	1,63
<b>D3</b>	165,1	1,87	2,07
<b>D4</b>	122,6	1,45	0,52
<b>D5</b>	42,2	1,75	1,90
<b>D6</b>	310,7	1,86	2,17
<b>D7</b>	174,3	1,86	2,07
<b>D8</b>	317,8	1,87	2,05
<b>D9</b>	65,4	1,95	1,46
<b>D10</b>	172,6	1,88	1,96
<b>D11</b>	222,5	1,88	2,06
<b>D12</b>	204	1,88	1,89
<b>D13</b>	161,2	1,89	2,02
<b>D14</b>	79,7	1,86	1,93
<b>D15</b>	101,9	1,94	1,96

---

**Anexo 6.** Resultados de Nanodrop de las muestras de Doberman (*continuación*).

<b>Muestras</b>	<b>Concentración ng/ul</b>	<b>Relación</b>	
		<b>260/280</b>	<b>260/230</b>
<b>D16</b>	2963,7	1,71	1,80
<b>D17</b>	83,9	1,83	1,63
<b>D18</b>	60,4	1,76	2,07
<b>D19</b>	56,7	1,85	0,52
<b>D20</b>	153,2	1,87	1,90
<b>D21</b>	85,9	1,82	2,17
<b>D22</b>	103,8	1,84	2,07
<b>D23</b>	61,5	1,74	2,05
<b>D24</b>	56,5	1,88	1,46
<b>D25</b>	30,9	1,78	1,96
<b>D26</b>	27,5	1,84	2,06
<b>D27</b>	147,9	2,01	1,89
<b>D28</b>	27,5	1,65	2,02
<b>D29</b>	24,9	1,70	1,93
<b>D30</b>	31,6	1,71	1,96
<b>D31</b>	19	1,65	1,45

**Anexo 7.** Resultados de genotipado de muestras de Pastor Alemán y Doberman

---

<b>Muestra</b>	<b>MDR1-1</b>	<b>MDR1-2</b>
OA1	AGAT	AGAT
OA2	AGAT	AGAT
OA3		
OA4	AGAT	AGAT
OA5	AGAT	AGAT
OA6	AGAT	AGAT
OA7	AGAT	AGAT
OA8	AGAT	AGAT
OA9	AGAT	AGAT
OA10	AGAT	AGAT
OA11	AGAT	AGAT
OA12	AGAT	AGAT
OA13	AGAT	AGAT
OA14	AGAT	AGAT
OA15	AGAT	AGAT
OA16	AGAT	AGAT
OA17	AGAT	AGAT

---

**Anexo 7.** Resultados de genotipado de muestras de Pastor Alemán y Doberman  
(continuación)

---

<b>Muestra</b>	<b>MDR1-1</b>	<b>MDR1-2</b>
OA18	AGAT	AGAT
OA19	AGAT	AGAT
OA20	AGAT	AGAT
OA21	AGAT	AGAT
OA22	AGAT	AGAT
OA23	AGAT	AGAT
OA24	AGAT	AGAT
OA25	AGAT	AGAT
OA26	AGAT	AGAT
OA27	AGAT	AGAT
OA28	AGAT	AGAT
OA29	AGAT	AGAT
OA30	AGAT	AGAT
OA31	AGAT	AGAT
OA32	AGAT	AGAT
OA33	AGAT	AGAT
OA34	AGAT	AGAT

---

**Anexo 7.** Resultados de genotipado de muestras de Pastor Alemán y Doberman  
(continuación)

---

<b>Muestra</b>	<b>MDR1-1</b>	<b>MDR1-2</b>
D1	AGAT	AGAT
D2	AGAT	AGAT
D3	AGAT	AGAT
D4	AGAT	AGAT
D5	AGAT	AGAT
D6	AGAT	AGAT
D7	AGAT	AGAT
D8	AGAT	AGAT
D9	AGAT	AGAT
D10	AGAT	AGAT
D11	AGAT	AGAT
D12	AGAT	AGAT
D13	AGAT	AGAT
D14	AGAT	AGAT
D15	AGAT	AGAT

---

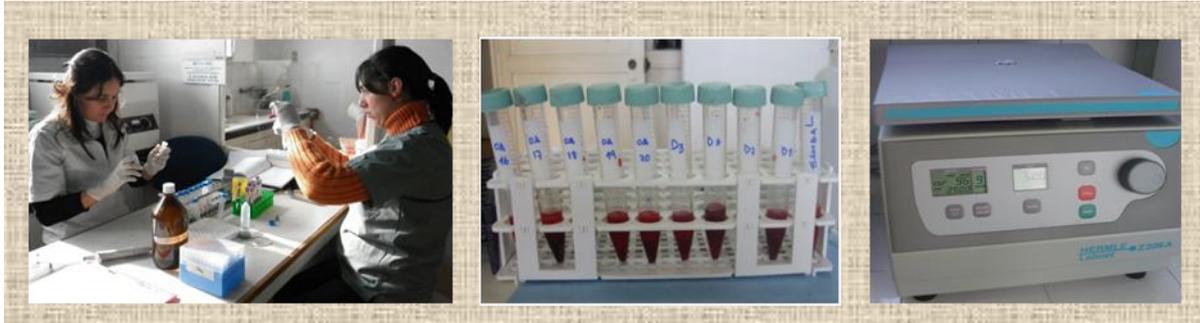
**Anexo 7.** Resultados de genotipado de muestras de Pastor Alemán y Doberman  
(continuación)

<b>Muestra</b>	<b>MDR1-1</b>	<b>MDR1-2</b>
D16	AGAT	AGAT
D17	AGAT	AGAT
D18	AGAT	AGAT
D19	AGAT	AGAT
D20	AGAT	AGAT
D21	AGAT	AGAT
D22	AGAT	AGAT
D23	AGAT	AGAT
D24	AGAT	AGAT
D25	AGAT	AGAT
D26	AGAT	AGAT
D27		
D28	AGAT	AGAT
D29	AGAT	AGAT
D30	AGAT	AGAT
D31	AGAT	AGAT

## Anexo 8. Fotos propias

### Extracción de ADN genómico de sangre entera

#### Primera Lisis



#### Segunda Lisis



#### Lavado y Digestión



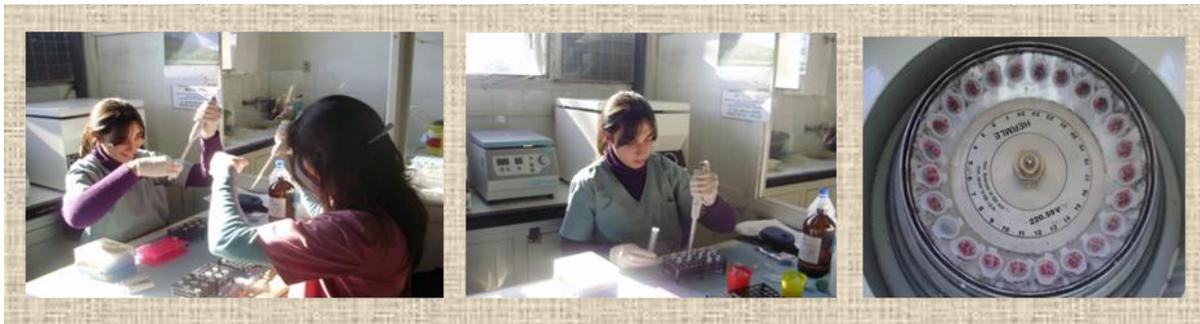
Anexo 8. Fotos propias (continuación)

**Extracción de ADN genómico de sangre entera**

**Digestión**



**Precipitación**



**Lavado y Dilución en Buffer**



**Anexo 8. Fotos propias (continuación)**

**Medida de la Concentración de ADN**



Anexo 8. Fotos propias (continuación)

Algunos de los perros muestreados

