

TESIS DE DOCTORADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

SUB-ÁREA GENÉTICA

PEDECIBA

***ANÁLISIS DE GENES RELACIONADOS CON LA
FARMACOGENÉTICA EN CANINOS DE DIFERENTES
RAZAS EN URUGUAY***

ROSA GAGLIARDI

2014

ORIENTADORA: DRA. MARÍA VICTORIA ARRUGA, FACULTAD DE
VETERINARIA, ZARAGOZA, ESPAÑA

CO-ORIENTADORA: DRA. SILVIA LLAMBÍ, FACULTAD DE VETERINARIA,
MONTEVIDEO, URUGUAY

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS.....	7
RESUMEN.....	8
INTRODUCCIÓN GENERAL.....	10
GENÉTICA/FARMACOLOGÍA/FARMACOGENÉTICA. UN POCO DE HISTORIA.....	10
FARMACOGENÉTICA.....	12
EL PERRO (<i>CANIS FAMILIARIS</i>) Y EL HUMANO.....	15
ORIGEN DEL PERRO DOMÉSTICO.....	17
LAS RAZAS CANINAS.....	18
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS (<i>INTRODUCCIÓN GENERAL</i>).....	22

CAPÍTULO 1. LA MUTACIÓN <i>MDR1-1Δ</i> EN CUATRO RAZAS CANINAS EN URUGUAY.....	24
INTRODUCCIÓN.....	24
La familia ATP-binding cassette (ABC).....	24
El gen <i>MDR1</i> y la glucoproteína P.....	26
El gen <i>MDR1</i> y los caninos.....	29
Razas caninas.....	31
OBJETIVOS.....	36
HIPÓTESIS.....	37
MATERIALES Y MÉTODOS.....	38
RESULTADOS	41
DISCUSIÓN.....	42
CONCLUSIONES.....	47
ANEXO 1. TÉCNICAS EMPLEADAS PARA LA EXTRACCIÓN DE ADN.....	48
ANEXO 2. RESULTADOS DE CONCENTRACIÓN Y PUREZA DEL ADN OBTENIDO, MEDIDO EN EL NANODROP ND1000 (LABORATORIO DE TÉCNICAS NUCLEARES)...	54
ANEXO 3. RESULTADOS DEL GENOTIPADO PARA LA MUTACIÓN <i>MDR1-1Δ</i>.....	58
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS (CAPÍTULO 1).....	62

CAPÍTULO 2. ANÁLISIS DE LOS EXONES 6 Y 7 DEL GEN <i>CYP2D15</i> EN PERROS CIMARRONES.....	65
INTRODUCCIÓN.....	65
Metabolismo de Fármacos: Citocromo P450	66
El gen <i>CYP2D15</i>.....	68
El perro Cimarrón Uruguayo.....	70
OBJETIVOS.....	75
HIPÓTESIS.....	76
MATERIALES Y MÉTODOS.....	77
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	79
ANEXO1. EXTRACCIÓN DE ADN CON FENOL-CLOROFORMO-ALCOHOL ISOAMÍLICO.....	92
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS (CAPÍTULO 2).....	94

CAPÍTULO 3. ANÁLISIS DE 26 SNPs PERTENECIENTES A LOS GENES <i>MDR1</i>, <i>CYP1A2</i> Y <i>CYP2B11</i> EN CUATRO RAZAS CANINAS EN URUGUAY.....	96
INTRODUCCIÓN.....	96
Transporte de fármacos: La superfamilia ATP binding cassette (ABC).....	97
Metabolismo de fármacos: La superfamilia del citocromo P450....	98
Razas caninas.....	104
OBJETIVOS.....	109
HIPÓTESIS.....	110
MATERIALES Y MÉTODOS.....	111
RESULTADOS.....	115
DISCUSIÓN.....	127
ANEXO 1. RESULTADOS DE GENOTIPOS.....	130
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS (CAPÍTULO 3).....	134

DISCUSIÓN GENERAL.....	138
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS (DISCUSIÓN GENERAL).....	141
CONCLUSIONES.....	143
PERSPECTIVAS.....	145

AGRADECIMIENTOS

A mis orientadoras, la Dra. María Victoria Arruga del Laboratorio de Citogenética y Genética Molecular de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Zaragoza, España, y la Dra. Silvia Llambí del Área Genética de la Facultad de Veterinaria, UdelaR, por su apoyo y orientación durante la realización de esta Tesis.

A mis compañeros y amigos del Área Genética de la Facultad de Veterinaria de Montevideo, Uruguay.

A los criadores y propietarios de los animales con los que se trabajó.

Al Dr. Bernardo Bertoni por sus aportes en el trabajo realizado con diferentes programas informáticos.

A los Dres. Diana Martínez, Pedro Sitjar y Beatriz Tellechea, por su colaboración en las actividades relacionadas al gen de resistencia múltiple a drogas.

A mi familia y amigos por acompañarme durante todo este proceso.

RESUMEN

En esta Tesis se estudian cuatro genes que codifican para proteínas relacionadas al metabolismo o transporte de fármacos. Estos genes se encuentran asociados a diferencias en la respuesta a tratamientos farmacológicos de los individuos. La **Farmacogenética** es una rama de la genética que se dedica a estudiar variantes presentadas por este tipo de genes y su asociación con las diferentes respuestas mencionadas.

El objetivo de esta Tesis es analizar la presencia de mutaciones en genes asociados al metabolismo o transporte de fármacos en razas caninas donde se han comunicado reacciones adversas a tratamientos farmacológicos. La misma se organiza en tres capítulos:

- **Capítulo 1:** La mutación *mdr1-1Δ* en cuatro razas caninas en Uruguay. En este capítulo se continúa con el estudio de la mutación mencionada, que se comenzó a trabajar en la Maestría. Esta mutación está asociada a la imposibilidad de administrar determinadas drogas a ciertas razas caninas. En la presente Tesis se amplía el número de razas estudiado. Las cuatro razas que se trabajan en este caso han presentado reacciones adversas a fármacos ó son razas en las que se ha descrito la mutación mencionada.
- **Capítulo 2:** Análisis de los exones 6 y 7 del gen *CYP2D15* en perros cimarrones. En este capítulo se busca profundizar en el estudio de polimorfismos para el gen mencionado en la única raza autóctona de caninos de nuestro país. La enzima codificada por este gen metaboliza gran cantidad de drogas utilizadas ampliamente en la Clínica Veterinaria.
- **Capítulo 3:** Análisis de 26 SNPs pertenecientes a los genes *MDR1*, *CYP1A2* y *CYP2B11* en cuatro razas caninas en Uruguay. En este capítulo se trabaja con un gen asociado a transporte y dos a metabolismo. Se estudian 26 SNPs de estos tres genes, las diferencias existentes con respecto a sus frecuencias en cuatro razas caninas (Ovejero Alemán, Labrador Retriever, Cimarrón Uruguayo y Collie), y sus posibles asociaciones con diferencias en la respuesta a fármacos.

Las conclusiones que se pueden considerar de estos tres capítulos son:

- En lo que respecta al primer capítulo, no se encontró la mutación estudiada en ninguna de las cuatro razas, pese a que en las mismas se hayan descrito reacciones adversas a fármacos ó que se trate de razas donde está descrita dicha mutación.
- En el segundo capítulo se encuentran diferentes polimorfismos en los animales

estudiados en los dos exones trabajados.

- En el tercer capítulo se presentan los resultados de los diferentes puntos trabajados en el mismo: frecuencias de los SNPs estudiados, posible asociación con diferencias en la respuesta a fármacos. Respecto del último punto, se encontró que algunos de los SNPs pueden ser empleados para realizar análisis de asociaciones con la respuesta a la terapia farmacológica.

Respecto de la Tesis en su conjunto, se presentan resultados de estudios realizados en diferentes genes que se han asociado con variaciones en la respuesta a terapias farmacológicas. Se amplían los estudios realizados en perros cimarrones, así como también en razas caninas muy difundidas en nuestro país ó que ya se han descrito en ellas reacciones adversas a fármacos.

Los análisis realizados en esta Tesis, llevan a que se continúen los estudios relacionados a la Farmacogenética en el Área Genética de Facultad de Veterinaria. Los resultados obtenidos se están publicando en revistas arbitradas, habiendo sido publicados dos trabajos, un trabajo fue aceptado y está para ser publicado, y otros dos están siendo evaluados en este momento:

Trabajos publicados:

- Gagliardi R, Llambí S, Arruga MV. (2014) Estudio de mutaciones puntuales en el gen de resistencia múltiple a drogas en caninos de Uruguay. AICA Vol. 4: 132-134
- Gagliardi R, Llambí S, Arruga MV. (2011) Estudio molecular del gen *CYP2D15* (citocromo P450 2D15) en el perro Cimarrón Uruguayo. AICA Vol. 1: 313-315

Trabajo aceptado:

- Gagliardi R, Martínez D, Tellechea B, Sitjar P, Llambí S, Arruga MV. Análisis de la mutación *mdr1-1Δ* del gen *mdr1* en cuatro razas caninas en Uruguay. Revista MVZ Córdoba.

Trabajos que están siendo evaluados:

- Gagliardi R, Llambí S, Arruga V. SNP genetic polymorphisms of *MDR- 1*, *CYP2B11* and *CYP2D15* genes in four canine breeds to study possible influence on toxicological evaluations.
- Gagliardi R, Llambí S, Munilla S, Arruga V. Study of different genetic markers (SNPs) in three genes (*ABCB1A*, *CYP1A2* and *CYP2B11*) related to drug resistance behaviour in canine populations.

INTRODUCCIÓN GENERAL

Cuando se instaura una terapia farmacológica se persigue el objetivo de lograr un efecto beneficioso en un paciente determinado, sin que se den reacciones adversas. En diferentes individuos, frente al mismo tratamiento, se pueden observar diferentes respuestas. Entre los factores que influyen en estas respuestas se puede ver:

- Edad del paciente.
- Salud/Enfermedad.
- Tratamientos simultáneos.
- Especie/Raza.
- Diferencias a nivel genético: Metabolismo y distribución de los fármacos, proteínas blanco donde actúan.

Quien se hace cargo de estudiar el último punto (factores genéticos que influyen en la respuesta a la terapia farmacológica) es la *Farmacogenética*.

GENÉTICA/FARMACOLOGÍA/FARMACOGENÉTICA. UN POCO DE HISTORIA

Una de las necesidades primordiales del hombre en la antigüedad era la búsqueda de “hierbas para aliviar el dolor y la pestilencia”. Las civilizaciones antiguas tenían compendios en los que se consideraba a las hierbas la base terapéutica. Uno de estos compendios que se ha empleado en India durante miles de años, es el *Ayurveda* (“ciencia y conocimiento de la vida”), del año 6000 a.C., donde se habla de hierbas empleadas solas o combinadas, para el tratamiento de las enfermedades. Otro ejemplo es el “Papiro de Ebers” del antiguo Egipto que data del año 1500 a.C. Esta medicina egipcia presentó una gran influencia sobre los griegos, quienes se veían atraídos por el efecto venenoso que podían tener determinadas hierbas. El ejemplo más clásico lo constituye el suicidio de Sócrates por la ingestión de un jugo de frutas, lo que puede considerarse el primer ejemplo de un caso de intoxicación.

A partir del siglo XVI comienzan a cuestionarse estos conceptos, surgiendo personas como *Copernicus* o *Versalius*, que establecen la observación y la experimentación como base del pensamiento científico. El alquimista *Paracelso* en el S XVI hace hincapié en la potencia variable de la medicación dependiendo de la dosis y de la vía de administración.

Durante la conquista de América, los conquistadores se encontraron con algunas sustancias que los indígenas empleaban para calmar ciertas dolencias o ejercer

determinados efectos. Algunos ejemplos son la corteza de quina para calmar fiebres, el masticar hojas de coca como estimulante.

Con el desarrollo de la química orgánica y analítica en el S XIX, empiezan a aislarse y caracterizarse los principios activos de las plantas.

Algunos autores dividen la historia del descubrimiento de fármacos en dos grandes períodos:

1. Desde principios del S XIX hasta alrededor de 1930. Se adapta el método científico para aislar y purificar productos naturales, obtener productos sintéticos, estudiar sus propiedades fisiológicas.
2. Desde 1930. Empieza lo que puede considerarse como el “enfoque racional diseño de fármacos”. A este enfoque siguió la búsqueda de los compuestos más activos pero menos tóxicos. Este enfoque, en cierta forma, continúa hasta la actualidad.

Pese a estos puntos, de todas formas, quien sigue siendo fuente de nuevos fármacos es la naturaleza. Lo que originalmente se dio con las plantas fue extendiéndose a microorganismos y al mar (Estévez, 2002).

La idea de que la herencia puede explicar las variaciones individuales en la respuesta a las drogas y la susceptibilidad a reacciones adversas, fue propuesta en 1957 (Mealey, 2006). Luego, en 1959, fue cuando se introdujo el término *farmacogenética* (Mealey, 2006). Se originó interés en esta época por el hecho de que se veía que en una subpoblación de personas, la primacrina, empleada contra la malaria, causaba hemólisis. Estas personas tenían niveles funcionales menores de la enzima glucosa 6-fosfato deshidrogenasa cuando se los comparaba con el resto de la población. La no existencia de estudios moleculares en ese momento, hacía que cualquier análisis se basara básicamente en la observación de lo que ocurría. La mutación causante de estos niveles menores de enzima se descubrió décadas más tarde.

Los estudios relacionados a la farmacogenética quedaron luego estancados hasta 1990, coincidiendo con el Proyecto Genoma Humano. A partir de ese momento, los estudios en el tema se han extendido notoriamente.

FARMACOGENÉTICA

El advenimiento de las técnicas moleculares le ha dado a estos estudios un enfoque muy distinto a aquel que se venía dando de únicamente poder observar fenotípicamente lo que ocurría. Lo que se busca es, cuando se ve un determinado fenotipo, encontrar la mutación responsable. En muchas ocasiones sucede lo contrario, se encuentran mutaciones sin conocer a priori, qué es lo que causan. Con la secuenciación de los genomas es más factible llegar al objetivo primordial de la farmacogenética, la terapia individualizada. Esta terapia individualizada, permitiría:

1. Conocer qué pacientes probablemente presentarían reacciones adversas a un tratamiento determinado.
2. Predecir qué pacientes son los que se beneficiarían con una droga determinada. Se estaría en condiciones de seleccionar el tratamiento más adecuado para un animal en particular sin necesidad de caer en el “ensayo y error” habitual.

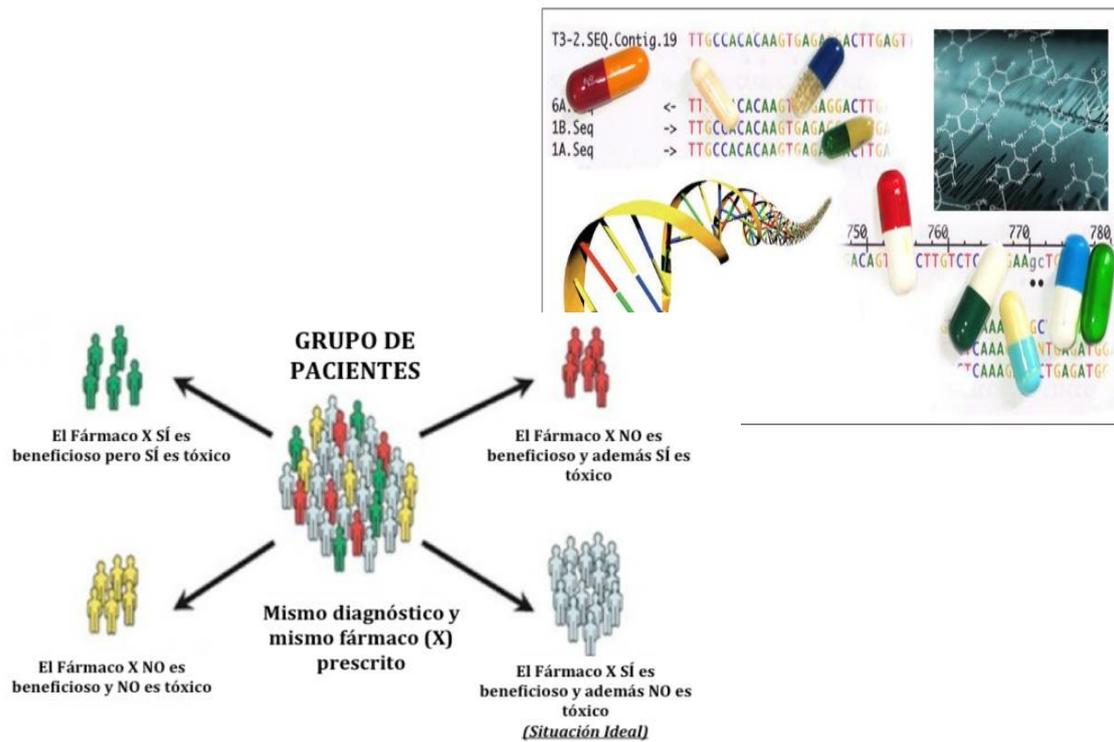
Estos dos puntos, básicamente son el resultado de diferencias en la absorción, distribución, metabolismo, excreción de las drogas, así como también de la interacción con el receptor (blanco) de la misma. Entre los elementos más estudiados se encuentra el metabolismo del fármaco. Dado que hasta hace pocos años se consideraba que la disponibilidad de las drogas dependía de sus características físico-químicas, se tomaba en cuenta particularmente el metabolismo hepático. Más recientemente se han visto otros factores que también influyen en dicha disponibilidad: El metabolismo intestinal fase I y la extrusión activa de las drogas por transportadores, son dos de los elementos más influyentes en la bio-disponibilidad de las drogas administradas por vía oral (Nishimuta *et al.*, 2013; Fleischer *et al.*, 2008; Martignoni *et al.*, 2006). Por lo tanto, la mayor influencia en este punto está dada por las variaciones genéticas en las enzimas de metabolismo expresadas a nivel intestinal y en los transportadores a este nivel. Estos transportadores juegan un papel fundamental en la absorción intestinal de las drogas. En Medicina Veterinaria, el mejor caracterizado es la glucoproteína-P, codificada por el gen *MDR1 (ABCB1)*. Este transportador es una proteína transmembrana descrita primariamente en líneas celulares tumorales resistentes. Las células tumorales que expresan esta glucoproteína son resistentes a una serie de antitumorales: Antraciclinas, vincristina, vinblastina, etc. La función normal de la GP-P es actuar como una bomba que expulsa sustancias extrañas, presentando una función de protección. A nivel intestinal estaría jugando un papel fundamental en la bio-disponibilidad de las drogas absorbidas a este nivel. El gen

ABCB1 en humanos, presenta un interés adicional, ya que se han descrito diferentes mutaciones asociadas a enfermedades. Desde otro enfoque, esta GP-P también juega un papel fundamental en la distribución de las drogas en el organismo una vez que se encuentran en la circulación general. El ejemplo clásico es cuando, dada su expresión a nivel de la barrera hemato-encefálica, previene la entrada de determinadas drogas al sistema nervioso central (SNC). En algunas razas caninas, existe una mutación que impide la producción adecuada de la proteína, lo que permite que ciertas drogas ingresen al SNC y sean capaces de producir intoxicación en el animal (Mealey, 2006; Dean *et al.*, 2001).

Otro punto de variación existe en lo que se refiere al metabolismo. Existen variaciones en los genes que codifican para enzimas que intervienen tanto en la fase I como en la fase II del metabolismo. En este punto, una de las familias más estudiadas es la familia del citocromo P450. Ejemplos de esta familia son el gen *CYP2D6* humano (con su ortólogo *CYP2D15* canino) asociado a una gran variación en la respuesta terapéutica. Otro ejemplo lo constituye el *CYP2B11* canino que se expresa a un nivel mucho menor en algunas razas (ej: galgos) (Wenker, 2009). Se han descrito numerosas mutaciones en otros genes de esta familia, pese a lo cual en muchas no se conoce el efecto exacto que presentan. Esto sucede por ejemplo con el gen *CYP1A2* que algunos autores encontraron perros de raza Beagle deficientes en su producto. Este gen, particularmente en humanos, es muy estudiado por haberse encontrado asociado a diferentes tipos de cáncer.

En lo que respecta a la excreción de las drogas, puede darse con la droga intacta ó con sus metabolitos. Las vías más importantes de eliminación son por riñón o por vía biliar. Nuevamente en este aspecto, la GP-P vuelve a jugar un rol fundamental ya que otro de los tejidos donde es expresada es en el renal.

A otros niveles, como pueden ser las proteínas receptoras de los fármacos, existen muy pocos estudios realizados. Pese a esto, es de suponer que estos receptores también presenten una gran influencia en la respuesta a tratamientos farmacológicos (Mealey, 2006).



En esta figura se ve como la farmacogenética importa al momento de instaurar una terapia farmacológica en distintos pacientes. El ejemplo es en humanos, se puede considerar la misma situación en pacientes de importancia veterinaria.

([www.unav.es640 x 326](http://www.unav.es640x326)Buscar por imágenes)

(lookfordiagnosis.com).

EL PERRO (*CANIS FAMILIARIS*) Y EL HUMANO

La relación entre perros y humanos se remonta a miles de años atrás, siendo el compañero de humanos más antiguo. Existen fósiles encontrados en Oriente Medio que datan de por lo menos 12000 años. El perro tiene la característica de que, por más que siempre hablamos de la misma especie, presenta una gran diversidad incluso desde un enfoque fenotípico. Encontramos razas como el Chihuahua donde el adulto pesa alrededor de 3kg hasta un Irish Wolfhound que, parado sobre sus dos patas, llega a alcanzar mayor altura que una persona de estatura media. Entre estos dos extremos existe una variedad enorme en lo que se refiere a tamaños, colores, funciones que desempeñan. Por más que el perro en la actualidad es un animal de compañía, existen razas que cumplen diversas actividades, como por ejemplo: Guía de personas invidentes (Labrador Retriever); guarda y defensa (Ovejero Alemán, Dobermann, etc); detector de drogas y explosivos (Ovejero Alemán, Ovejero Belga); trabajo con ganado menor (Border Collie, Kelpie australiano); trabajo con ganado mayor (Collie, Cimarrón); caza (Galgos, Dogos, etc); compañía (Caniche, razas chicas en general, etc); etc. Existen a nivel mundial, más de 400 razas caninas que son capaces de adaptarse al rol que les toca cumplir, sin poder determinar su número exacto dado que aparecen razas nuevas continuamente (Hall, 2008; Greer *et al.* 2003).

Yo, como perro guía, estoy habituado para viajar en todo medio de transporte echado a los pies de mi amo ciego sin causar molestias a los pasajeros, tanto dentro como fuera del país.





www.blogmascotas.com



www.abc.es



www.acalama.es

En las imágenes anteriores pueden verse diferentes ámbitos donde el perro ha sido y es importante para el hombre. Entre ellos se ven la caza, perro guía, animal de compañía, compañero de juegos. En algunos casos este animal incluso llega a ser considerado un miembro de la familia.

ORIGEN DEL PERRO DOMÉSTICO

DOMESTICAR (<http://etimologias.dechile.net/?domesticar>): La palabra "Domesticar" viene del latín domesticus y este deriva de domus (casa). Esto se refería a tomar animales salvajes y hacerlos que trabajen en la casa.

REAL ACADEMIA ESPAÑOLA: domesticar. (De doméstico)

(<http://buscon.rae.es/drae/html/boton.htm>):

1. tr. Reducir, acostumar a la vista y compañía del hombre al animal fiero y salvaje.
2. tr. Hacer tratable a alguien que no lo es, moderar la aspereza de carácter. U. t. c. prnl.

Existen datos arqueológicos que indican que los perros domésticos aparecieron en Oriente Medio entre 12.000 y 14.000 años atrás. Los lobos grises (*Canis lupus*) y los chacales dorados (*Canis aureus*) podrían ser sus ancestros, siendo cada especie responsable de diferentes razas. Pese a esto, existen diversos estudios filogenéticos que demuestran que únicamente los lobos grises son ancestros directos del perro doméstico (Wayne & Vilà, 2001; http://www.animalscience.com/uploads/additionalFiles/WPSA2_files/bruford.pdf). En un inicio, los perros eran muy similares a los lobos. Las diferencias existentes en la actualidad pueden deberse básicamente a la selección artificial más los cambios culturales de las sociedades humanas. El momento donde puede comenzar a verse los efectos de la domesticación puede haber sido cuando el hombre pasó de una cultura cazadora-recolectora a sociedades más agrícolas (Wayne & Vilà, 2001). También hay elementos que sugieren, por comparaciones morfológicas, que los perros son los más cercanos a los lobos chinos (Wayne & Vilà, 2001; Greer *et al.*, 2003).

Las familias de carnívoros modernos se originaron hace aproximadamente 40-50 millones de años. De esa época data el Miacis, un carnívoro pequeño con cuerpo largo y patas relativamente cortas, del cual son descendientes directos los dos primeros tipos de cánidos que se desarrollaron en Norteamérica:

- Daphoenus: Fue el primero de los perros osos. Grande, pesado y de cola larga.
- Cynodictis: Pequeño y más delgado.

El *Daphoenus* evolucionó en osos. El *Cynodictis* se asemejó mucho a las civetas, de él surgieron:

- *Temnocyon*: Su línea de evolución culminó en los perros de caza de África y de la India. El perro de caza africano y el *Lycaon*, perro de caza de la India oriental o Dhole, son muy parecidos al perro pero su ascendencia es muy diferente.
- *Cynodesmus*: Predecesor de un grupo grande y variado de cánidos que incluye los perros modernos, lobos y zorros americanos y eurasiáticos.

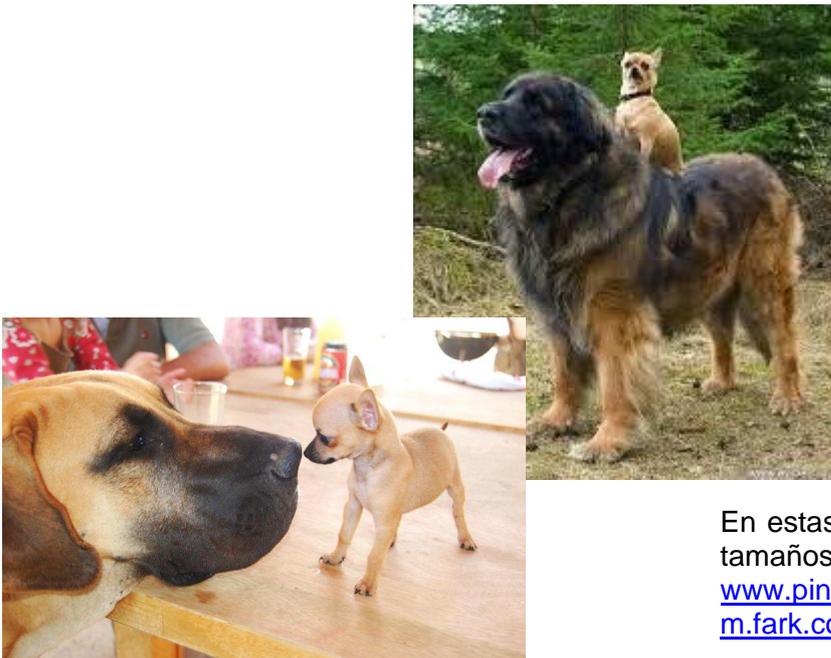
Los perros verdaderos evolucionaron entre el Mioceno superior y el presente como vástago del tronco principal *Cynodesmus*, y tuvieron su origen inmediato en un género conocido como *Tomarctus* (Vilà *et al.*, 1999). El perro doméstico pertenece a la familia *Canidae* que está dentro de la superfamilia *Canoidea* y ésta, dentro del orden *Carnivora*. Los *Canidae* son el linaje más antiguo filogenéticamente dentro de la superfamilia *Canoidea*, habiendo divergido hace 50 millones de años. Se han reconocido tres subfamilias de cánidos (Wayne & Vilà, 2001):

- *Hesperocyoninae*: Incluye los miembros más antiguos y primitivos de la familia, encontrándose en la transición de Oligoceno a Mioceno.
- *Borophaginae*: Sustituyó a la anterior. Fueron los predadores más comunes del período Terciario.
- *Caninae*: Incluye a todos los representantes actuales de la familia. Aparece en el Mioceno tardío. (Greer *et al.*, 2003).

LAS RAZAS CANINAS

Un grupo de individuos con ancestros en común y que los distinguen una serie de características desarrolladas por selección artificial y mantenidas por una propagación controlada, es lo que se conoce como raza. Si se consideran diferentes especies animales, los caninos son una de las que presenta la mayor diversidad en lo que se refiere a características físicas entre razas. Uno de los ejemplos más extremo es la diferencia presentada entre el Chihuahua y el Gran Danés. Hay más de 400 razas caninas reconocidas mundialmente, encontrándose algunas de ellas más relacionadas entre sí que otras (Fleischer *et al.*, 2008). La Federación Cinológica Internacional (FCI) es una organización mundial, con sede en Bélgica, integrada por 88 miembros (uno por país). Según figura en la declaración de la Misión de la FCI: “La FEDERATION CYNOLOGIQUE INTERNATIONALE (FCI) es la autoridad máxima a nivel mundial para la cinofilia. La FCI es responsable del aseguramiento de la salud de los perros y

de las actividades caninas internacionales para fomentar las relaciones entre los perros y las personas.” Entre los puntos que se plantean en esta Misión se menciona que “LA FCI considera que la salud, el carácter y el comportamiento de los perros son las cuestiones más importantes en lo que se refiere a los perros y a su estándar de raza.” Esta organización es quien se hace cargo de reconocer y aceptar a nuevas razas a nivel mundial. Existe una clasificación, en donde la organización va incluyendo a estos animales. En el caso de nuestro país, a inicios del año 2006 reconoció provisionalmente al perro Cimarrón Uruguayo como raza, a inicios de 2011 se dio su reconocimiento definitivo (Llambí &Gagliardi, 2013).



En estas fotos se ven razas de tamaños extremos.

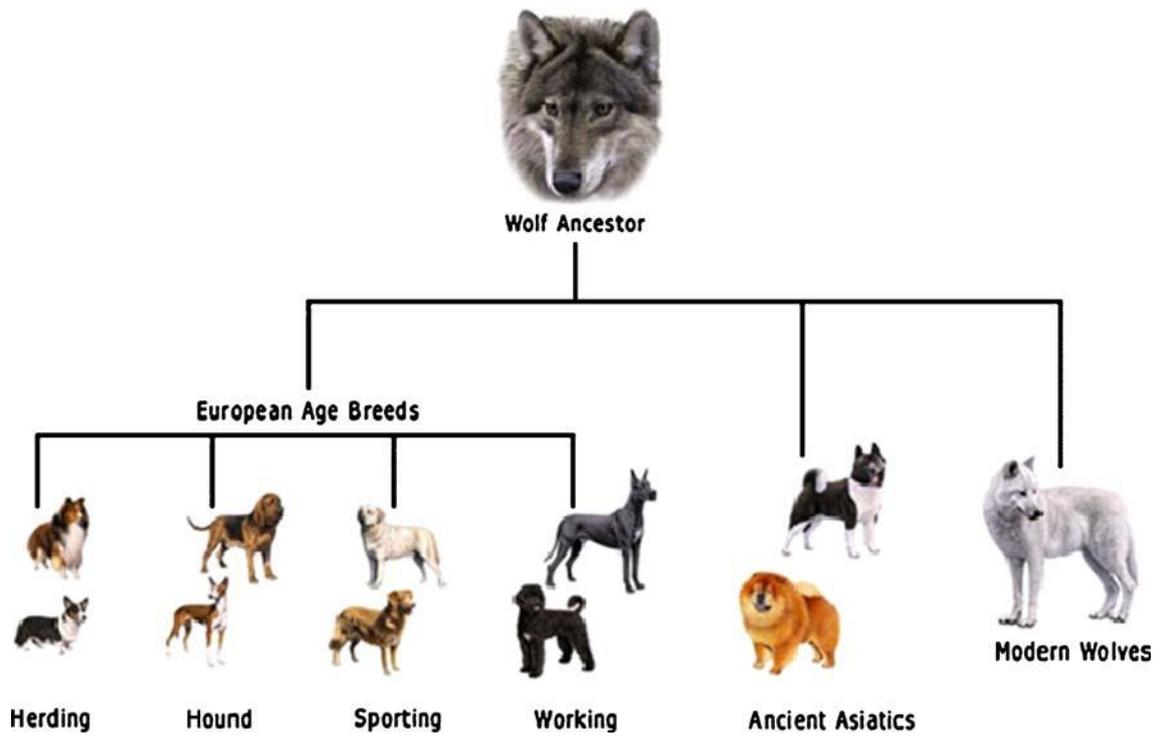
www.pinterest.com

m.fark.com

Nomenclatura de las razas			
A - B - C - D - E - F - G - H - I - J - K - L - M - N - O - P - Q - R - S - T - U - V - W - X - Y - Z			
■ Grupo 1	Perro de Pastor y Perros Boyeros (excepto Perros Boyeros Suizos)	■ Grupo 2	Perros Tipo Pinscher y Schnauzer - Molosoides - Perros Tipo de Montaña y Boyeros Suizos
■ Grupo 3	Terriers	■ Grupo 4	Teckels
■ Grupo 5	Perros Tipo Spitz y Tipo Primitivo	■ Grupo 6	Perros Tipo Sabueso, Perros de Rastro y Razas Semejantes
■ Grupo 7	Perros de Muestra	■ Grupo 8	Perros Cobradores de Caza - Perros Levantadores de Caza - Perros de Agua
■ Grupo 9	Perros de Compañía	■ Grupo 10	Lebroles
■ Razas aceptadas provisionalmente			

Esta imagen es tomada de la página de la Federación Cinológica Internacional (FCI). Esta organización nuclea a las diferentes razas caninas, agrupándolas en los grupos que se ven en el tabla (la explicación completa está en el texto) (www.fci.be).

Cada una de las razas tiene sus propias características genéticas distintivas. Esto lleva a que se presenten patrones específicos de enfermedades y esperanzas de vida muy diferentes en cada una de ellas. Teniendo en cuenta esta gran variación, se llega a la existencia de diferencias metabólicas y fisiológicas entre ellas que influyen en la presencia de enfermedades específicas de raza así como también a diferencias en la respuesta a los tratamientos farmacológicos (Fleischer *et al.*, 2008).



En esta imagen se presenta la genealogía de los caninos presentada por Fleischer *et al.* 2008. (Fleischer *et al.*, 2008).

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS (INTRODUCCIÓN GENERAL)

- Dean M, Rzhetsky A, Allikmets R. (2001) The Human ATP-Binding Cassette (ABC) Transporter Superfamily. *Genome Res.* 11: 1156-1166
- Estévez J. Origen de las sustancias medicamentosas. Pp 3-19. En Botana L, Landoni F, Martín-Jiménez T. *Farmacología y Terapéutica Veterinaria*, pp 734. Editorial: Mc Graw-Hill/Interamericana de España. ISBN-84-486-0471-7
- Fleischer S, Sharkey M, Mealey K, Ostrander E, Martinez M. (2008) Pharmacogenetic and Metabolic Differences Between Dog Breeds: Their Impact on Canine Medicine and the Use of the Dog as a Preclinical Animal Model. *The AAPS Journal* 10: 110-119
- Greer K, Cargill E, Cox M, Clark L, Tsai K, Credille K, Dunstan R, Venta P, Murphy K. (2003) Digging up the canine genome-a tale to wag about. *Cytogenet Genome Res* 102: 244-248
- Hall D. (2^o edición 2008) *Guía completa de razas caninas*. Lisma ediciones, S. L. 2007 ISBN- 978.84.95677-23-3
- Llambí S, Gagliardi R. (2013) *Conociendo al perro cimarrón uruguayo*. Editado por bibliotecaplural, UdelaR. ISBN: 978-9974-0-0996-7
- Martignoni M, Groothuis G, de Kanter R. (2006) Species differences between mouse, rat, dog, monkey and human CYP-mediated drug metabolism, inhibition and induction. *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology* 2: 875-894
- Mealey K. (2006) Pharmacogenetics. *Vet. Clin. Small Anim.* 36: 961-973
- Nishimuta H, Nakagawa T, Nomura N, Yabuki M. (2013) Species differences in hepatic and intestinal metabolic activities for 43 human cytochrome P450 substrates between humans and rats or dogs. *Xenobiotica*, Early Online: 1-8
- Vilà C, Maldonado J, Wayne R (1999) Phylogenetic Relationships, Evolution, and Genetic Diversity of the Domestic Dog. *The Journal of Heredity* 90 (1)
- Wayne, R. K. y Vilá, C. (2001) Phylogeny and Origin of the Domestic Dog. En: Ruvinsky, A. y Sampson, J. *The Genetics of the Dog*. New York, CABI Publishing. 1-11

- Wenker A. (2009) Genetic variation in the coding regions of the canine P2B11 gene - Implications for Veterinary Medicine?. Tesis Doctoral. Facultad de Veterinaria. Universidad de Utrech. (Holanda).
- <http://buscon.rae.es/drae/html/boton.htm>
- <http://etimologias.dechile.net/?domesticar>
- http://www.animalscience.com/uploads/additionalFiles/WPSA2_files/bruford.pdf
- www.fci.be

Direcciones de imágenes

- lookfordiagnosis.com
- [www.unav.es640 x 326](http://www.unav.es640x326) Buscar por imágenes
- angelicaitalia.blogspot.com
- m.fark.com
- www.abc.es
- www.acalama.es
- www.blogmascotas.com
- www.pinterest.com

CAPÍTULO 1. LA MUTACIÓN *MDR1-1Δ* EN CUATRO RAZAS CANINAS EN URUGUAY

INTRODUCCIÓN

La familia ATP-binding cassette (ABC)

La familia de proteínas transportadoras ABC (ATP-binding cassette) es una de las familias más grandes de proteínas de transporte trans-membrana. En la figura 1.1 se muestran los integrantes de la misma, en humanos. En eucariotas, la mayoría de los genes ABC codifican para proteínas que movilizan sustancias desde el citoplasma al exterior celular o a un compartimento extracelular. Los genes que forman parte de esta familia se encuentran dispersos en el genoma y son muy conservados entre diferentes especies. Se dividen en subfamilias, según la similitud en la estructura del gen, el orden de los dominios y la homología en la secuencia de los dominios. En mamíferos, se encuentran descritas siete subfamilias ABC: *ABCA* (*ABC1*), *ABCB* (*MDR/TAP*), *ABCC* (*CFTR/MRP*), *ABCD* (*ALD*), *ABCE* (*OABP*), *ABCF* (*GCN20*), *ABCG* (*White*). En humanos, la subfamilia *ABCA*, contiene algunas de las proteínas de mayor tamaño; dos de los miembros de esta familia han sido ampliamente estudiados en esta especie dada su relación con el colesterol y la vitamina A. La subfamilia *ABCB*, es donde está *ABCB1*, el primer transportador clonado y caracterizado. El interés despertado por este transportador se debe a su capacidad de producir resistencia múltiple a drogas, particularmente en células tumorales. La subfamilia *ABCC*, presenta un amplio espectro de acción: Transporte iónico, receptores de superficie celular, secreción de toxinas. La subfamilia *ABCD* se relaciona al transporte de ácidos grasos. *ABCE* y *ABCF* no se han visto asociadas a transporte de membranas. *ABCG* ha sido estudiada más que nada en *Drosophila* por su asociación con el transporte de pigmentos (Dean *et al.*, 2001). De estas subfamilias, en caninos la más estudiada es la *ABCB*, particularmente el gen *ABCB1* (*MDR1*) dada su asociación con la intoxicación por fármacos en algunas razas de la especie. Esto se ha visto particularmente en animales de la raza Collie y razas emparentadas y lebreles, en especial cuando se usa el antiparasitario ivermectina (Geyer *et al.*, 2005; Neff *et al.*, 2004; Mealey *et al.*, 2001).

Table 1. List of Human ABC Genes, Chromosomal Location, and Function

Gene	Alias	Location	Subfamily	Expression	Function
ABCA1	ABC1	9q31.1	ABC1	Ubiquitous	Cholesterol efflux onto HDL
ABCA2	ABC2	9q34	ABC1	Brain	Drug resistance
ABCA3	ABC3, ABCC	16p13.3	ABC1	Lung	
ABCA4	ABCR	1p22.1-p21	ABC1	Photoreceptors	N-retinylidene-PE efflux
ABCA5		17q24	ABC1	Muscle, heart, testes	
ABCA6		17q24	ABC1	Liver	
ABCA7		19p13.3	ABC1	Spleen, thymus	
ABCA8		17q24	ABC1	Ovary	
ABCA9		17q24	ABC1	Heart	
ABCA10		17q24	ABC1	Muscle, heart	
ABCA12		2q34	ABC1	Stomach	
ABCA13		7p11-q11	ABC1	Low in all tissues	
ABCB1	PGY1, MDR	7p21	MDR	Adrenal, kidney, brain	Multidrug resistance
ABCB2	TAP1	6p21	MDR	All cells	Peptide transport
ABCB3	TAP2	6p21	MDR	All cells	Peptide transport
ABCB4	PGY3	7q21.1	MDR	Liver	PC transport
ABCB5		7p14	MDR	Ubiquitous	
ABCB6	MTABC3	2q36	MDR	Mitochondria	Iron transport
ABCB7	ABC7	Xq12-q13	MDR	Mitochondria	Fe/S cluster transport
ABCB8	MABC1	7q36	MDR	Mitochondria	
ABCB9		12q24	MDR	Heart, brain	
ABCB10	MTABC2	1q42	MDR	Mitochondria	
ABCB11	SPGP	2q24	MDR	Liver	Bile salt transport
ABCC1	MRP1	16p13.1	CF/MRP	Lung, testes, PBMC	Drug resistance
ABCC2	MRP2	10q24	CF/MRP	Liver	Organic anion efflux
ABCC3	MRP3	17q21.3	CF/MRP	Lung, intestine, liver	Drug resistance
ABCC4	MRP4	13q32	CF/MRP	Prostate	Nucleoside transport
ABCC5	MRP5	3q27	CF/MRP	Ubiquitous	Nucleoside transport
ABCC6	MRP6	16p13.1	CF/MRP	Kidney, liver	
CFTR	ABCC7	7q31.2	CF/MRP	Exocrine tissue	Chloride ion channel
ABCC8	SUR	11p15.1	CF/MRP	Pancreas	Sulfonylurea receptor
ABCC9	SUR2	12p12.1	CF/MRP	Heart, muscle	
ABCC10	MRP7	6p21	CF/MRP	Low in all tissues	
ABCC11	MRP8	16q11-q12	CF/MRP	Low in all tissues	
ABCC12	MRP9	16q11-q12	CF/MRP	Low in all tissues	
ABCD1	ALD	Xq28	ALD	Peroxisomes	VLCFA transport regulation
ABCD2	ALDL1, ALDR	12q11-q12	ALD	Peroxisomes	
ABCD3	PXMP1, PMP70	1p22-p21	ALD	Peroxisomes	
ABCD4	PMP69, P70R	14q24.3	ALD	Peroxisomes	
ABCE1	OABP, RNS41	4q31	OABP	Ovary, testes, spleen	Oligoadenylate binding protein
ABCF1	ABC50	6p21.33	GCN20	Ubiquitous	
ABCF2		7q36	GCN20	Ubiquitous	
ABCF3		3q25	GCN20	Ubiquitous	
ABCG1	ABC8, White	21q22.3	White	Ubiquitous	Cholesterol transport?
ABCG2	ABCP, MXR, BCRP	4q22	White	Placenta, intestine	Toxin efflux, drug resistance
ABCG4	White2	11q23	White	Liver	
ABCG5	White3	2p21	White	Liver, intestine	Sterol transport
ABCG8		2p21	White	Liver, intestine	Sterol transport

Figura 1.1. Genes ABC en humanos (extraído de Dean *et al.*, 2001)

El gen *MDR1* y la glucoproteína P

El gen *MDR1* (*ABCB1*) que codifica para la glucoproteína P (GP-P), forma parte de la familia ABC de transportadores de membrana. Se expresa en diversos tejidos con función secretora o excretora, entre los que se encuentran hígado (membrana canalicular de los hepatocitos), riñón (membrana luminal de los túbulos proximales), colon (borde en cepillo de la membrana de los enterocitos). También se expresa en los capilares del cerebro y del testículo, en los trofoblastos en la placenta y en las “stem cell” hematopoyéticas (Maitra *et al.*, 2001; Geyer *et al.*, 2005). La expresión de esta proteína en estos tejidos ocasiona que se limite la absorción de drogas por el intestino, se promueva la eliminación de drogas por bilis, orina e intestinos, y se restrinja la entrada de drogas al SNC (Geyer *et al.*, 2005). De esta forma, la función esencial de la GP-P en tejidos no neoplásicos, es conferir una resistencia múltiple a drogas (MDR) intrínseca, eliminando xenobióticos (fármacos) potencialmente tóxicos del organismo y previniendo su entrada al SNC y a los órganos reproductivos (Geyer *et al.*, 2005).

La función de la GP-P es actuar como una bomba dependiente de ATP que transporta un amplio rango de sustancias no relacionadas estructuralmente como ser drogas, toxinas y xenobióticos. La importancia funcional que presenta esta proteína se ha estudiado ampliamente en ratones y en células de los capilares del cerebro porcino. En particular, los ratones “knock out” *Mdr1a* (-/-) son saludables y presentan una fertilidad normal en condiciones estándar de laboratorio. Pese a esto, tienen una sensibilidad incrementada a drogas reconocidas como sustrato de la GP-P. (Geyer *et al.*, 2005; Neff *et al.*, 2004) Uno de los ejemplos más conocidos en Medicina Veterinaria es el caso de la ivermectina. Esta droga ha sido muy empleada a nivel mundial, a partir de la década de 1980 como endectocida, antiparasitario útil contra parásitos externos e internos. Su modo de acción (figura 1.2), al igual que el de otras lactonas macrocíclicas, es aumentar la permeabilidad de la membrana celular a los iones cloro, produciendo una paralización de la musculatura de los parásitos. Estos canales de cloro se encuentran ampliamente distribuidos en el sistema nervioso de numerosos Phyla de invertebrados (Geyer *et al.*, 2005; Neff *et al.*, 2004; Lifschitz *et al.*, 2002). Están filogenéticamente relacionados con los canales de cloro dependientes del neurotransmisor GABA en vertebrados. Normalmente, las concentraciones de ivermectina en el plasma de mamíferos son en el entorno de 10 veces mayores que en el SNC ya que la GP-P limita su pasaje debido a su función en la barrera hematoencefálica. Esto causa que el contacto de la ivermectina con las neuronas sensibles al GABA en mamíferos, que se encuentran en el SNC, se encuentre restringida, contrariamente a lo que sucede en parásitos. El hallazgo que se dio en ratones “knock-

out” *mdr1a* (-/-) fue que las concentraciones de ivermectina en el cerebro fueron notoriamente mayores que en ratones de fenotipo salvaje. Esto ocasiona la muerte de estos animales (Geyer *et al.*, 2005). Uno de los hallazgos principales que llevó a estudiar esta situación fue cuando en un laboratorio en el que se empleaban ratones, 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. Una vez estudiado el caso, se llegó a que los ratones muertos presentaban la mutación mencionada.

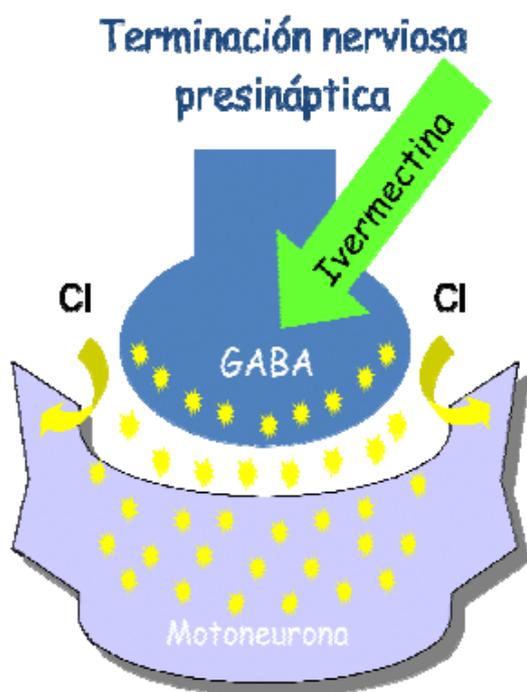


Figura 1.2. Modo de acción de la ivermectina (imagen tomada de <http://piel-l.org/libreria/wp-content/uploads/2010/12/ivermectina-graf.gif>)

Otro elemento fundamental que ha llevado al estudio de este gen es el hecho de que la resistencia a múltiples drogas es uno de los mayores impedimentos para lograr un tratamiento exitoso con quimioterápicos en muchos tumores, particularmente en humanos. Uno de los factores que se ha descrito como causante de este problema, es la sobre-expresión de la GP-P (Tomiyasu *et al.*, 2014; Wu *et al.*, 2014). Cuando se da esta sobre-expresión, el pronóstico clínico suele ser pobre (Maitra *et al.*, 2001). En la tabla 1.1 se ven los fármacos con los que interactúa la GP-P.

En humanos, se ha dado una explosión respecto de lo que se refiere a estudios en genes que tienen relación con las respuestas a terapias farmacológicas y a los efectos

que la epigenética está desarrollando en la expresión de los genes (Gibney & Nolan, 2010). En Medicina Veterinaria no se ha dado la misma situación. Pese a esto, se han comunicado diferencias entre razas en la respuesta a sustancias tanto endógenas como exógenas en bovinos, ovinos, pollos, cerdos y caninos (Fleischer *et al.*, 2008). Quien se encarga de este tipo de análisis es la Farmacogenética, rama de la Genética que se ha responsabilizado de estudiar las asociaciones entre diferentes genes y las diferencias en la respuesta a tratamientos farmacológicos entre los individuos.

ANTITUMORALES	DOXORRUBICINA, DOCETAXEL, VINCRISTINA, VINBLASTINA, ETOPÓSIDO, MITOXANTRONA, ACTINOMICINA D.
HORMONAS ESTEROIDES	ALDOSTERONA, CORTISOL, DEXAMETASONA, METILPREDNISOLONA.
AGENTES ANTIMICROBIANOS	ERITROMISINA, KETOCONAZOL, ITRACONAZOL, TETRACICLINA, DOXICICLINA, LEVOFLOXACINA, SPARFLOXACINA.
OPIOIDES	LOPERAMIDA, MORFINA.
DROGAS CARDÍACAS	DIGOXINA, DILTIAZEM, VERAPAMILO, TALINOLOL.
INMUNOSUPRESORES	CICLOSPORINA, TACROLIMUS.
MISCELÁNEOS	IVERMECTINA, AMITRIPTILINA, TERFENADINA, ONDANSETRON, DOMPERIDONA, FENOTIAZINAS, VECURONIUM.

Tabla 1.1. Resumen de drogas sustrato de la glucoproteína P (extraído de Mealey, 2006).

El gen *MDR1* y los caninos

En la Clínica Veterinaria, se conoce la frase “*white feet, don't treat*” (Dowling, 2006), lo que en español ha resultado en “*hocico largo, no tratar*” cuando se habla de realizar tratamientos con ivermectina en caninos. Esto es por el hallazgo realizado en el año 2001 de la mutación *mdr1-1Δ* en perros de la raza Collie (Mealey *et al.*, 2001). Respecto de esta mutación, tres elementos son fundamentales:

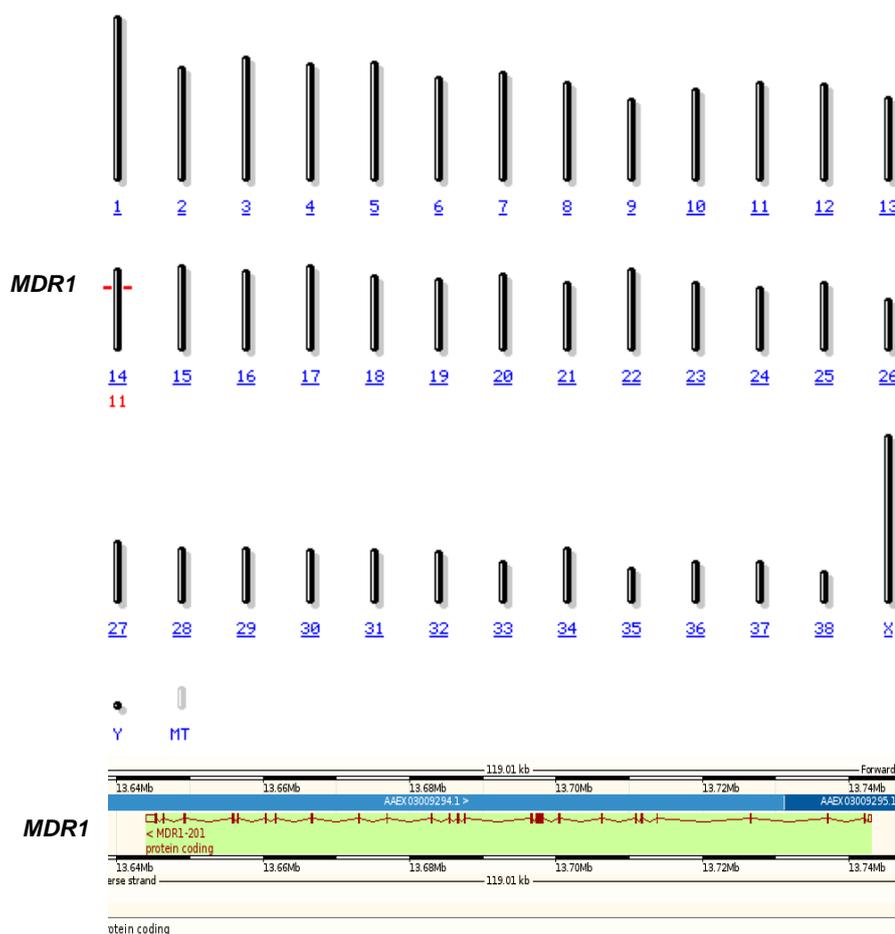
1. Los Collie no son la única raza que presenta la mutación.
2. La presencia de esta mutación ocasiona la formación de múltiples codones stop.
3. Existen gran cantidad de fármacos ampliamente usados en veterinaria que son sustrato de la GP-P.

En lo que respecta al primer punto, también se ha descrito a *mdr1-1Δ* en razas relacionadas a los Collie: Border Collie, Bearded Collie, Old English Sheepdog, Shetland Sheepdog, etc.; así como también en razas relacionadas a los lebreles (galgos). Diversos autores estudiaron a la mutación mencionada en diferentes razas. En el caso del trabajo de Neff, se analizaron más de 4000 caninos de razas puras, entre las cuales se encuentran varias del linaje de los Collie. Entre los elementos que se destacan en este trabajo, mencionan que la mutación se encuentra en los perros pastores de origen británico mientras que en los de origen continental no la presentan. Por otra parte comunican, como anecdótico, que dos razas (Longhaired Whippet y Silken Windhound) que no presentan relación con los Collie, presentan la mutación (Mealey, 2006; Geyer *et al.*, 2005; Neff *et al.*, 2004).

Los codones stop mencionados en el segundo punto ocasionan que se produzca una GP-P menor al 10% de lo normal. La función de bombeo de la GP-P depende de sitios de unión al ATP, de sitios de unión a los sustratos, de sitios de fosforilación y de múltiples motivos de membrana. Al formarse una GP-P menor al 10% de lo normal, no se presentan estos sitios por lo que no puede cumplir con su función. Entre otros efectos, estos elementos hacen que diversos fármacos, incluida la ivermectina, ingresen al SNC de los animales en donde se presenta *mdr1-1Δ* (Mealey, 2006; Geyer *et al.*, 2005; Neff *et al.*, 2004).

Por último, existe una gran cantidad de fármacos que son sustratos de la GP-P, entre los que se encuentran ivermectina, ketoconazol, tetraciclinas, diversos antitumorales; entre los más usados en la clínica (Mealey, 2006; Mealey *et al.*, 2001). En la tabla 1.1 se presentan los fármacos sustrato de esta proteína.

En la figura 1.3 se presenta la ubicación del gen *MDR1* en caninos (búsqueda realizada con el programa MapViewer). En esta especie se localiza en el cromosoma 14, es un gen con 28 exones, dando un producto que consta en 1281 residuos aminoacídicos (datos tomados de Ensembl). La mutación estudiada (*mdr1-1Δ*) está ubicada en el exón 4 del gen (Geyer *et al.*, 2005; Neff *et al.*, 2004; Mealey *et al.*, 2001).



TATTTGGAAAGTAGAGCAAACATCCATGAAACTGTGCTAATTCCTATTCTT
TACATTTTCTTTCTTTTTTTTTTTTTTTAGTTTCGCTATTCAAATTGGCTTGAT
AGGTTGTATATGTTGGTGGGACAATGGCTGCCATCATCCATGGAGCTGCA
CTCCCTCATGATGCTGGTTTTTGGAAACATGACAGATAGCTTTGCAAATG
CAGGAATTTCAAGAAACAAAACATTTCCAGTTATAATTAATGAAAGTAAGTATT
ATTTGTGGCACTGATCTTAGAGGTTTGAAGAAAAATCTGTTACTTAGAAGGA
TGTTTAGCCCTCATTAAATACATTAGTGTGTTTATTTCTGGGGGAAAAGGGA

Figura 1.3. La mutación *mdr1-1Δ*. En la parte superior se muestra la ubicación del gen *MDR1* en el idiograma canino (tomada de MapViewer), luego se muestra al gen *MDR1* con sus exones e intrones (tomada de Ensembl). En la parte inferior está la secuencia de la región del gen *MDR1* donde se ubica la delección *mdr1-1Δ*. Las 4pb correspondientes a la misma, se marcan en rojo y subrayado.

Razas caninas

Existen más de 400 razas caninas reconocidas internacionalmente por la FCI. En nuestro país existe una única raza de esta especie autóctona (Cimarrón Uruguayo). Por otra parte, existen razas muy difundidas en nuestro medio y otras que revisten interés particular en Medicina Veterinaria por su reacción a diferentes tratamientos farmacológicos. En esta sección se describen cuatro razas que en algún punto tienen un interés particular.

El Ovejero Alemán



Pastor Alemán



Pastor Blanco Suizo (http://es.wikipedia.org/wiki/Pastor_blanco_suizo)

El perro Ovejero Alemán presenta un muy buen comportamiento de guardia, característica que se debe principalmente a su territorialidad; también presenta una gran capacidad para el aprendizaje, una excelente respuesta al entrenamiento de obediencia y una gran versatilidad. Este perro puede cumplir con una gran variedad de funciones: guardia, guía de personas invidentes, detector de drogas y explosivos, animal de salvamento, compañía, perro policía. Una de sus características más interesantes es su estabilidad de carácter (<http://www.fci.be>).

El origen de estos animales data del año 1899, precisamente en Alemania. Son parte de los perros pastores de origen europeo continental, siendo inicialmente entrenados para reunir y vigilar ovejas. Maximilian von Stephanitz, capitán de caballería del ejército alemán, fue el responsable de dar origen a esta raza. En 1899 se creó la Asociación de Amigos del Pastor Alemán, iniciándose una selección de ejemplares cuyos cruces mejoraron diferentes aspectos del animal. *Horand von Grafath* fue el primer perro Pastor Alemán inscripto. Era de carácter firme, vigoroso, de pelaje grisáceo y aspecto lobuno (http://es.wikipedia.org/wiki/Pastor_aleman). La particularidad de este animal fue que tanto su abuelo como muchos de sus hijos fueron blancos (<http://www.pastorblancosuizo.net/inicio.php?page=raza>). Estos animales blancos, tanto en Europa (Alemania) como en Estados Unidos, fueron eliminándose, por considerarse en el estándar racial el pelaje blanco como un defecto eliminatorio. En la década de 1960, en Alemania, se inició una campaña contra los Ovejeros Alemanes blancos que casi lleva a su desaparición en Europa. En Estados Unidos se fue dando la misma situación hasta la creación del Club del Pastor Alemán blanco que defendió a estos animales. En Europa, se reintrodujo esta variedad en la década de 1970, siendo en Suiza donde se expandieron más estos perros. El 5 de marzo de 1996 nace *Lobo*, perro americano que se considera como antepasado de la raza *Pastor Blanco Suizo* en Suiza. Sus descendientes y otros perros pastores blancos importados de Estados Unidos y Canadá se multiplicaron gradualmente y, al día de hoy, se puede encontrar al perro Pastor Blanco Suizo por toda Europa. En EEUU y Canadá se ha ido reconociendo a estos animales como una raza diferente. A partir de junio de 1991 se han ido registrando estos perros como una raza nueva en el Libro de Orígenes Suizo (Morris *et al.*, 2007; <http://www.fci.be>). En la actualidad, ambas razas pueden considerarse por separado, sin que existan cruzamientos entre ellas (<http://www.fci.be>).

En nuestro país, esta raza se encuentra muy difundida como animal de trabajo (guarda, guía, policía, detector de armas y drogas, etc) y perro de compañía.

El Border Collie

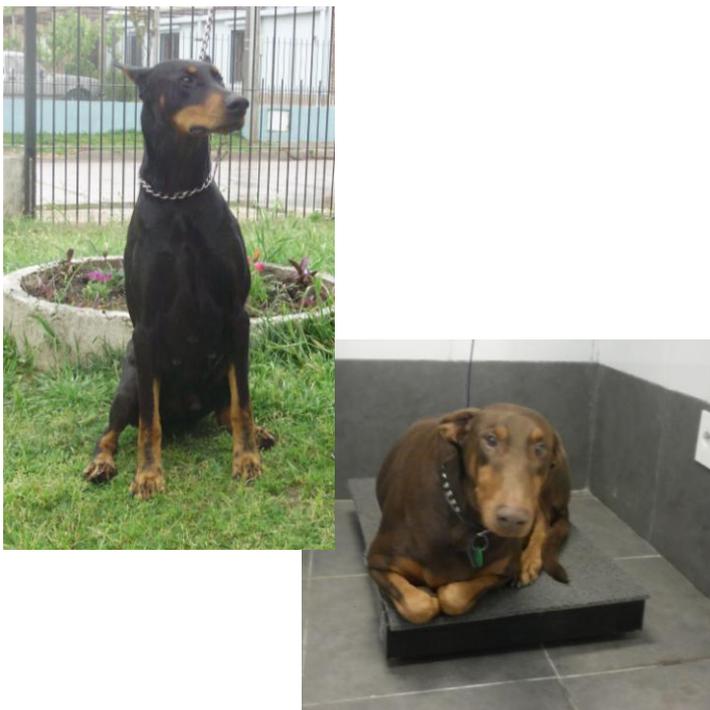


Los perros Border Collie en un principio fueron perros de trabajo, particularmente como perro pastor que agrupaba y conducía rebaños. En nuestro país, una de las funciones que cumplen hasta el día de hoy, es el trabajo con ovejas. Es una de las razas caninas más obediente y de las de mayor utilidad que existe (Border Collie: Perro útil de la frontera). Son perros muy inquietos y excitables, de gran energía, muy ágiles, lo que lleva a que sea aconsejable que vivan al aire libre en grandes espacios. En este momento, también se pueden encontrar como perros de compañía, aunque es aconsejable tener en consideración la necesidad de espacio que presentan. Respecto de las características físicas que presentan, según la Federación Cinológica Internacional (<http://www.fci.be>) son animales de apariencia atlética, con las costillas bien arqueadas, pecho profundo y más bien amplio, lomo ancho y musculoso, vientre no levantado al nivel del flanco, su cuerpo es ligeramente más largo que la altura medida a la región de la cruz (<http://www.fci.be>).

Su origen se dio en las tierras altas de Escocia, donde se introdujeron sus precursores entre los siglos V AC y I AC por las comunidades celtas, instaladas primariamente en Irlanda, de donde viene el nombre "collie" (útil en galés). Más tarde, al irse trasladando a regiones escocesas, se crea la raza Highland Collie que va a dar origen al Border Collie.

Esta raza es muy empleada como perro ovejero, está emparentada con el Collie donde se han dado diversas reacciones adversas a fármacos.

El Dobermann



Dada la característica de ser un gran defensor de su territorio, este perro es un muy buen perro de guardia. Presenta una gran capacidad para el aprendizaje y es bueno en el entrenamiento de obediencia. Son animales que siempre están en estado de alerta. Se adaptan mejor a lugares amplios. Tienen la característica de ser animales dominantes y, en el caso de los machos, pueden ser agresivos con animales del mismo sexo.

El origen de esta raza se remonta a fines del siglo XIX, siendo creada por Friederich Louis Dobermann (2 de enero, 1834 - 9 de junio, 1894), un recaudador de impuestos alemán que administraba un “rastros” (refugio) y tenía el derecho legal de atrapar a todos los perros que anduviesen libres. Los "perros de carnicero" jugaron el papel más importante en la formación de la raza Dobermann, que en las últimas décadas del S XIX, ya eran vistos como una raza en sí misma. Esos perros fueron precursores del Rottweiler, que se cruzaron con un tipo de perro Pastor de color negro con marcas rojo-óxido que era común en la región de Turingia. Dada la variedad de perros a los que tuvo acceso Dobermann, empleó gran variedad de razas entre las que se incluyen el Pinscher, Boyero de Montaña Bernés, Manchester terrier, Galgo, Pastor de Beauce, Rotweiler, Pointer, Weimaraner (Morris, 2007; <http://www.es.wikipedia.org/wiki/Dobermann>). Dadas las condiciones de este perro, a principios del S XX el Dobermann se reconoció oficialmente como perro policía. “La crianza del Dobermann dio como resultado un perro mediano, fuerte y musculoso, que a pesar de toda su substancia permite reconocer elegancia y nobleza. Es idóneo como perro de compañía, protección y utilidad.” (<http://www.fci.be>).

En nuestro país es un perro muy empleado en guarda y defensa.

El Galgo



En particular, el galgo español es una raza muy antigua, habiendo referencias del galgo ibérico ya en el tratado del siglo II a.c Cynegeticus, de Arriano de Nicodemia, cónsul de la Bética (antigua Provincia Romana situada en la península Ibérica). Se considera que el galgo inglés (Greyhound) surgió a partir del galgo español, más antiguo. En nuestro país, los galgos generalmente son cruza entre diferentes clases de galgos. Esto se ha dado con el propósito de obtener animales más veloces para la competencia en los canódromos, poniendo en peligro la pureza del galgo español. En nuestro país, estos animales se los ve en actividades de caza, particularmente de liebres, y también como animal de compañía.

Son animales de complexión fuerte, erguido, de proporciones generosas, musculatura poderosa y formación simétrica. Cabeza y cuello largos, buena posición de los hombros, pecho bien delineado, cuerpo espacioso, lomo arqueado, cuartos poderosos, extremidades y pies fuertes; desarrollan una alta velocidad en un corto período de tiempo, Federación Cinológica Internacional (<http://www.fci.be>).

En nuestro país, es una raza muy empleada en la caza de liebres y en carreras. Por estas características, se ve sometido a diversos tratamientos farmacológicos (vitaminas, etc).

OBJETIVOS

Objetivo general

Analizar la presencia de la mutación *mdr1-1Δ* y su frecuencia en muestras de cuatro razas caninas en Uruguay.

Objetivos específicos

- Estudiar la presencia de la mutación *mdr1-1Δ* en cuatro muestras de caninos de raza Ovejero Alemán, Border Collie, Dobermann y Galgo en Uruguay.
- Analizar la frecuencia de la mutación *mdr1-1Δ* en las razas Ovejero Alemán, Border Collie, Dobermann y Galgo en Uruguay.

HIPÓTESIS

- a. La mutación *mdr1-1Δ*, del gen *MDR1*, se encuentra en las razas Ovejero Alemán, Border Collie, Galgo y Dobermann de nuestro país.
- b. De ser así, ¿en qué frecuencia se encuentra en cada una de las razas estudiadas?

MATERIALES Y MÉTODOS

Toma y conservación de muestras

Se analizaron 106 caninos distribuidos de la siguiente manera:

- 34 de la raza Ovejero Alemán.
- 31 de la raza Dobermann.
- 23 de la raza Galgo.
- 18 de la raza Border Collie.

Las muestras sanguíneas se tomaron de la vena antebraquial o de la safena, en condiciones de asepsia, desinfectándose la zona con alcohol y empleando materiales estériles (jeringas, mariposas, etc.). Se empleó EDTA potásico como anticoagulante. Una vez obtenidas las muestras, se mantuvieron congeladas o refrigeradas hasta su procesamiento en el Área Genética de la Facultad de Veterinaria. En la figura 1.4 se muestran los lugares de donde se obtuvieron las muestras de los animales estudiados.

Las muestras se tomaron con el consentimiento de los propietarios de los animales siguiendo las normas de la CHEA (Comisión Honoraria de Experimentación Animal).



Figura 1.4. Zonas de donde se obtuvieron las muestras estudiadas.

Extracción de ADN y análisis del genotipo para el gen *MDR1*

En el anexo 1 se presentan las técnicas de extracción de ADN empleadas. Las mismas, una vez obtenidas fueron medidas en Nanodrop ND 1000, para conocer su concentración y pureza.

Las muestras analizadas se enviaron a genotipar al servicio GeneSeek, Neogen Corporation | 25155 Network Place| Chicago, Illinois 60673-1251. En la figura 1.5 se muestra la región estudiada, donde se presenta la mutación *mdr1-1Δ*.

```
TATTTGGAAAGTAGAGCAAACATCCATGAAACTGTGCTAATTCCTATTCTTTACAT
TTTCTTTCTTTTTTTTTTTTTTTTTTTAGTTTCGCTATTCAAATTGGCTTGATAGGTTGTATA
TGTTGGTGGGGACAATGGCTGCCATCATCCATGGAGCTGCACTCCCTCTCATGAT
GCTGGTTTTTGGAAACATGAC AGATAGCTTTGCAAATGCAGGAATTTCAAGAAACA
AACTTTTCCAGTTATAATTAATGAAAGTAAGTATTATTTGTGGCACTGATCTTAGAG
GTTTGAAGAAAATCTGTTACTTAGAAGGATGTTTAGCCCTCATTAAATACATTAGTG
TGTTTATTTCTGGGGGAAAAGGGA
```

Figura 1.5. Se muestra la región del gen *MDR1* estudiada. En rojo y subrayado se muestra la secuencia que se pierde en presencia de la mutación *mdr1-1Δ*.

RESULTADOS

En el anexo 2 se muestran los resultados obtenidos de las diferentes medidas tomadas en el nanodrop ND1000 (Laboratorio de Técnicas Nucleares, Facultad de Veterinaria). La concentración de ADN correspondió a la medida tomada a 280nm. La pureza del ADN se evaluó por el valor obtenido en la relación 260/280. Puede verse una gran variación respecto de los resultados obtenidos. Estos variaron según la técnica de extracción de ADN empleada (anexo 1) y también según la forma de conservación de la muestra sanguínea (refrigerada o congelada). Los valores más adecuados de concentración y pureza se lograron con las muestras de Ovejero Alemán y Dobermann. La diferencia con las otras razas (Galgo y Border Collie) fue que en las primeras se empleó la técnica de extracción de ADN con acetato de amonio mientras que en estas últimas, se realizó la técnica de extracción de ADN con sal. Respecto de la forma de conservación de las muestras, generalmente los mejores resultados se obtuvieron cuando la muestra era refrigerada y su procesamiento inmediato, que cuando se congeló y se procesó un tiempo después.

En el anexo 3 se muestran los resultados obtenidos del genotipado de las muestras estudiadas, recibidos del Laboratorio GeneSeek, Lincoln, Nebraska, EEUU. En las razas Ovejero Alemán, Dobermann y Galgo, se logró genotipar la mayoría de las muestras; en cada una de las dos primeras razas no se pudo determinar el genotipo de un animal (OA3 y D27). En la raza Border Collie pudo analizarse el genotipo de la mitad de los animales en estudio (9 de 18).

DISCUSIÓN

Calidad del ADN trabajado

De las cuatro razas trabajadas, en Ovejero Alemán y en Dobermann, los resultados de concentración (medida a 280nm) y pureza del ADN (relación 260/280) fueron buenos (anexo 2). De todas formas, como se menciona en resultados, en un animal de cada una de las dos razas no pudo determinarse el genotipo del gen *MDR1*. El motivo que puede haber llevado a esto se desconoce, ya que los factores que pudieron tomarse en cuenta en nuestro laboratorio dieron dentro de los parámetros recomendables para los estudios de genotipado. Dado el fin de este trabajo, de conocer la situación general de las razas, no se repitió el análisis de estas muestras. En lo que respecta a las razas Galgo y Border Collie, la situación es diferente. Los valores de concentración y pureza de ADN no son tan buenos. El primer punto al que se puede hacer referencia es a la técnica empleada. La extracción de ADN en estos casos se realizó mediante la técnica que emplea sal (anexo 1.a.) mientras que en los casos anteriores se empleó la técnica con acetato de amonio (anexo 1.b.). A este punto se suma el procesamiento, la forma y tiempo de conservación de las muestras. La mayoría de las muestras de Ovejero Alemán y Dobermann fueron procesadas en el laboratorio poco después de ser extraídas mientras que las de Galgo y Border Collie el tiempo en que se procesaron fue mayor. También se debe tener en cuenta que la mayoría de las muestras de las dos primeras razas se mantenían refrigeradas hasta su procesamiento y las dos últimas se congelaban. De todas formas, como estos factores no se dieron en todos los casos, no se estaría explicando 100% las diferencias obtenidas.

Genotipos para la mutación *mdr1-1A* en las cuatro razas estudiadas

En el anexo 3 se muestran los resultados de los genotipos en todos los casos analizados. En ninguno de los 95 casos estudiados (30: Dobermann, 33: Ovejero Alemán, 23: Galgos, 9: Border Collie) se detectó la mutación mencionada. Dadas las características que presentan cada una de estas razas podía esperarse la presencia de la misma por más que fuera en frecuencias bajas.

Ovejero Alemán: En ninguno de los animales de esta raza se detectó la mutación estudiada. Existen comunicaciones de diversos autores, en Estados Unidos que mencionan que en el Ovejero Alemán de pelaje blanco, las frecuencias de la misma son elevadas (Mealey *et al.*, 2006; Neff *et al.*, 2004). Los estudios realizados en Europa mencionan que el Ovejero Alemán no presenta la mutación estudiada. La

diferencia entre estas dos regiones es que en EEUU se habla del Ovejero Alemán blanco mientras que en Europa, estos animales conforman la raza *Pastor Blanco Suizo*. Según las reglas de la FCI, ambas razas son independientes y no deberían cruzarse entre sí. Debe considerarse que el Pastor Blanco Suizo presenta la mutación *mdr1-1Δ* en frecuencia elevada (Geyer *et al.*, 2007, Gramer *et al.*, 2011). La particularidad que se da en este caso, es la ambigüedad existente al considerar a los animales blancos como una raza separada (Pastor Blanco Suizo) o como la variedad de Ovejeros Alemanes de color blanco. En nuestro país pueden encontrarse perros de raza Pastor Blanco Suizo, sin embargo, se debe considerar que se trata de una raza relativamente “nueva”, que en algunos países ha sido reciente su aceptación como raza independiente. Por otra parte, también se debe tomar en cuenta:

- La gran densidad de ejemplares de Pastor Alemán presentes en Uruguay.
- Todas las muestras que se analizaron en este trabajo provinieron de la región sureste del país.
- Veterinarios clínicos que consideran a la raza Pastor Alemán como una de las que se debe tener precaución a la hora de instaurar determinados tratamientos farmacológicos.
- La cercanía del Ovejero Alemán con el Pastor Blanco Suizo.

Estos puntos hacen de interés el continuar analizando esta raza desde diferentes enfoques (genéticos, clínicos), aumentar el número de muestras estudiado, analizar animales de otras regiones del país.

Dobermann: Previamente, en esta raza, se han comunicado casos de intoxicación por ivermectina. Uno de los animales involucrados ingirió cantidades excesivas del fármaco causándole neurotoxicidad, dado que este caso se dio antes de que fuera descrita la mutación *mdr1-1Δ*, no se pudo estudiar su presencia (Hopkins *et al.*, 1990). Bissonnette *et al.*, 2008, también realizaron estudios donde vieron que en razas donde no se ha descrito la mutación *mdr1-1Δ*, que se tratan con lactonas macrocíclicas, en particular ivermectina, ocasionalmente se ven signos subclínicos de toxicidad. Esto lo describen en casos de tratamientos prolongados de más de 2-6 semanas de administración oral de lactonas macrocíclicas, en especial ivermectina. Estos tratamientos son necesarios en determinados casos como ser la demodicosis generalizada. En este trabajo se estudiaron 28 animales de razas donde no se encuentra descrita la mutación estudiada. Uno de ellos fue un perro Dobermann de un

año de edad que estaba siendo tratado con ivermectina para demodicosis generalizada. Este animal presentó sintomatología neurológica (midriasis, hiperactividad). El diagnóstico para la mutación *mdr1-1Δ* dio negativo, siendo homocigoto normal. Neff *et al.*, 2004 también estudiaron animales de la raza Dobermann (seis), sin embargo tampoco encontraron la mutación mencionada. En nuestro país, también se tiene precaución al momento de tratar animales de esta raza. Esto se da por el conocimiento de casos donde se han dado signos de toxicidad. En este trabajo se analizaron treinta perros Dobermann, habiendo dado todos ellos un genotipo homocigoto normal. En ninguno de estos treinta casos se disponían de datos clínicos respecto de intoxicación con ivermectina u otra lactona macrocíclica, ni de tratamientos con estas drogas. El estudiar estos animales da un indicio de qué sucede con la raza en nuestro país. De todas formas, se debe considerar que existen razas donde sí se ha descrito la mutación, que la presentan en una frecuencia muy baja (Geyer *et al.*, 2005; Neff *et al.*, 2004). Este punto sumado a que:

- son una raza de “hocico largo”, como se discutió anteriormente,
- existen pocos trabajos que la hayan estudiado,
- se han descrito casos de intoxicación por ivermectina,

lleva a que sea de interés ampliar los estudios que se realicen en la raza Dobermann.

Galgos: En este caso, en ninguna de las 23 muestras analizadas se detectó la mutación *mdr1-1Δ*. En estudios previos realizados en razas emparentadas con estos animales (lebreles) se encontró que la mutación se encuentra en una frecuencia elevada. Esto se da en particular en Silken Windhound y Longhair Whippet (Neff *et al.*, 2004). Estos autores estudiaron más de 4000 muestras de perros de diferentes razas, algunas donde se encontraba descrita la mutación y otras no. En el caso de los lebreles, los estudiaron por datos anecdóticos de intoxicación con ivermectina, no porque la mutación hubiera estado descrita. El haberla encontrado y el que estuviera en frecuencias elevadas, fue un dato inesperado (Neff *et al.*, 2004). En este trabajo, no se detectó la mutación *mdr1-1Δ* en ninguno de los animales analizado. Esto puede deberse a diferentes puntos:

- La mutación estudiada no se encuentra en los galgos de nuestro país, ó se encuentra en baja frecuencia. En el segundo caso puede ser que el número de animales estudiados no sea suficiente para encontrarla.

- La mayoría de los galgos en nuestro país no son específicamente Greyhound (galgo inglés) ó Galgo Español, sino que suelen existir cruizas entre ellos.
- Las razas de lebreles donde se describió previamente la mutación no son galgos en sí mismo, sino que son razas emparentadas con ellos. Puede ser que en ellos no se encuentre la mutación.

Los perros de esta raza son más frecuentes en la periferia de Montevideo o en departamentos del interior del país donde se dan carreras de perros. Los galgos suelen ser animales de caza o que se usan para correr, en estos canódromos, sometidos muchas veces a variedad de tratamientos farmacológicos, como ser suplementos vitamínicos, frente a los cuales también se pueden obtener diversas respuestas. Pese a los puntos que se mencionan anteriormente, considerando el manejo que tiene esta raza en nuestro país y lo poco analizada que está, interesa profundizar en su estudio desde distintos puntos de vista, incluso en lo que se refiere a genes involucrados en la respuesta a tratamientos farmacológicos.

Border Collie: En esta raza pudieron analizarse únicamente nueve animales. Las dificultades que se presentaron fueron por un lado, conseguir un número de animales que fuera representativo desde un punto de vista estadístico. Una vez que se obtuvieron las muestras, la dificultad estuvo en lograr una técnica de extracción de ADN que dejara ADN de buena calidad. Según se ve en el anexo 2, las concentraciones y las calidades de los ADN de estas razas son menores que en las demás. Tampoco se descarta alguna dificultad en el genotipado en sí mismo, las muestras que se enviaron a GeneSeek estaban dentro de los requerimientos necesarios para analizarse (anexo 2). Pese a estos elementos, en ninguno de los nueve animales que se conoció el genotipo, presentó la mutación *mdr1-1Δ*. En trabajos previos donde se trabajó con perros Border Collie, fue disímil el resultado obtenido. En el caso de Neff *et al.*, 2004, la mutación no se encuentra. Sin embargo, en el trabajo de Geyer *et al.*, 2005, donde estudian 334 perros de raza Border Collie, se detecta la mutación en una frecuencia alélica de 0,6% y Mizukami *et al.*, 2012 también identifican el alelo mutado con una frecuencia baja. Considerando el número de animales que estudiaron en este trabajo, es de esperar que si en nuestro país también se encontrara una frecuencia baja, en los nueve animales genotipados no se estaría en condiciones de encontrarla. Neff discute que la presencia de la mutación es importante en perros pastores de origen británico, contrariamente a los pastores de origen en Europa continental. En la figura 1.6 se muestra el linaje de los Collie. Dado

que los Border Collie son parte del mismo, siendo perros pastores de origen británico, interesa continuar con su estudio, aumentando el número de muestras con el fin de detectar la presencia de la mutación. Además de este hecho, también se considera que esta raza es una de las más empleadas a nivel de campo en el trabajo con ganado menor (ovinos) y, en la actualidad, también se pueden encontrar como animales de compañía.

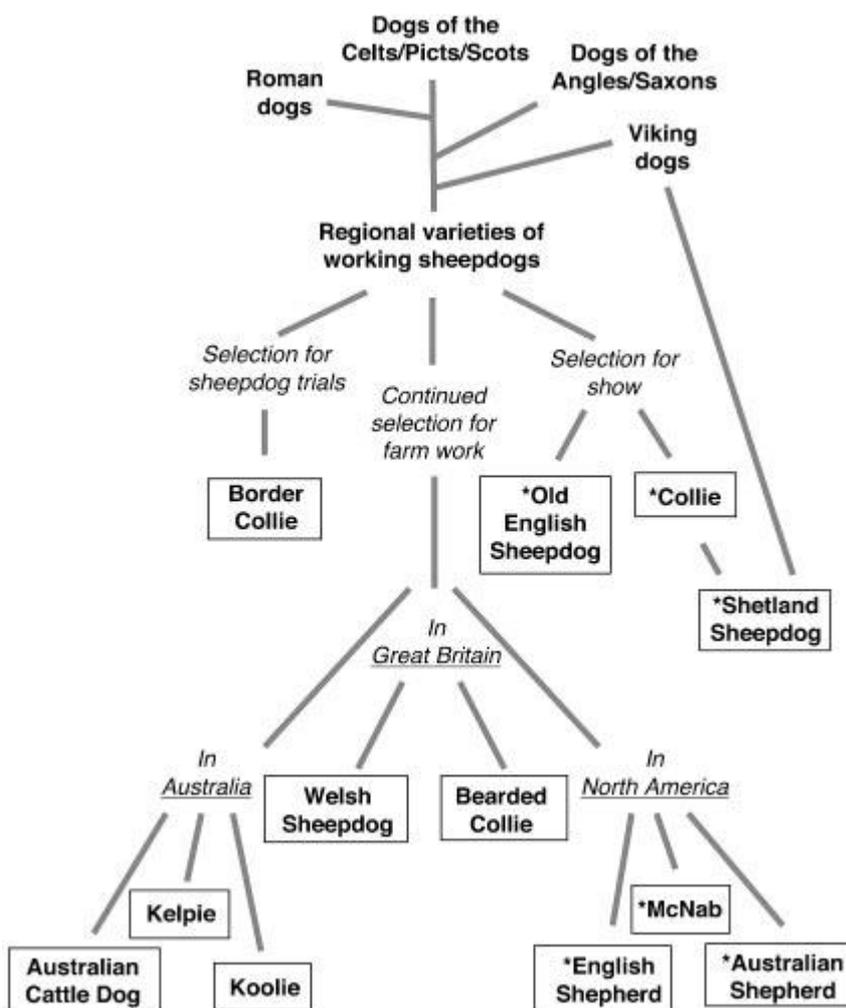


Figura 1.6. Linaje de los Collie (extraído de Neff *et al.*, 2004).

CONCLUSIONES

En ninguna de las cuatro razas se encontró la mutación *mdr1-1Δ* del gen *MDR1* estudiada, pese a que en ellas se comunicaron reacciones adversas a determinados tratamientos farmacológicos. Estas reacciones podrían deberse a otras mutaciones en otros lugares del gen *MDR1* ó a variaciones presentes en otros genes. Estos puntos se plantean también en trabajos previos. También se mencionan las razas donde no se describió la mutación *mdr1-1Δ* pero sí existen casos de intoxicación (Neff *et al.*, 2004). Estos elementos llevan a considerar que:

- La sensibilidad a fármacos podría deberse a mutaciones aun no identificadas en otras regiones del gen *MDR1*.
- Los casos de intoxicación también podrían darse por cambios en otros genes que intervengan en el transporte de drogas de la misma subfamilia u otra.
- Las causantes de los efectos adversos podrían ser enzimas que participan en el metabolismo de las drogas (ej. Citocromo P450).

(Bissonnette *et al.*, 2008; Neff *et al.*, 2004).

En trabajos previos realizados en el Área Genética de la Facultad de Veterinaria, se estudiaron perros cimarrones comparándolos con Collie y otras razas caninas no relacionadas. En el único caso donde se presentó la mutación fue en los Collie (Llambí & Gagliardi, 2013; Gagliardi, 2009). En nuestro país, los Collie y las razas emparentadas con ellos, no son de las más frecuentes. Sin embargo, son razas de trabajo, sumamente útiles en el trabajo de campo con ganado a lo que al día de hoy se suma su ubicación en el lugar de perros de compañía, dadas las características que presentan. Los primeros resultados que refieren al gen *MDR1*, que figuran en el libro “Conociendo al perro cimarrón uruguayo” se obtuvieron en esta raza. Las cuatro razas estudiadas en este trabajo, es la primera vez que se estudian en nuestro país respecto de la mutación de interés. Las cuatro razas presentan una gran importancia como animales de trabajo, en distintos aspectos según de cual de ellas se trate. Dos de ellas se encuentran diseminadas en el país (Pastor Alemán, Dobermann), una de ellas en el medio rural (Border Collie) y el Galgo como animal de competición. Si se consideran las características que presenta cada raza, la función de cada una de ellas en nuestro medio, que las cuatro están dentro de las razas “de hocico largo”, interesa ampliar los estudios realizados en ellas, incluso aumentando el número de muestras estudiado y buscando correlacionar los resultados que se obtengan con datos clínicos de los animales.

ANEXO 1. TÉCNICAS EMPLEADAS PARA LA EXTRACCIÓN DE ADN

EXTRACCIÓN DE ADN GENÓMICO A PARTIR DE SANGRE ENTERA

Animal Genomics, AgResearch Invermay, NZ, Abril 2008

Esta técnica se empleó en los animales de raza Border Collie.

PROCEDIMIENTO

PRIMERA LISIS

- Invertir suavemente la muestra de sangre, controlando que no tenga coágulos. En caso de haber alguno, “pescarlo” con una pipeta Pasteur de plástico y descartarlo.
- Colocar la muestra de sangre (10 mL, aproximadamente) en tubos Falcon de 50 mL rotulados.
- Agregar 20 mL de SLGR 1X (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 min.
- Descartar el sobrenadante.

SEGUNDA LISIS

- Agregar 10 mL 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 una pipeta Pasteur de plástico y descartarlo.
- Centrifugar (sin tapar) a 2500 rpm por 5 min.
- Descartar el sobrenadante e invertir los tubos sobre papel para quitar el exceso de líquido del pellet.

LAVADO

- Agregar 10 mL de TBS 1X . Tapar y agitar suavemente para disgregar el pellet.
- Centrifugar (sin tapar) a 2500 rpm por 5 min.
- Descartar el sobrenadante e invertir los tubos sobre papel para quitar el exceso de líquido del pellet.

- El pellet debe quedar blanco. Si estuviera rojo (o rosado en la superficie), agregar TBS 1X suavemente con una pipeta Pasteur para lavar su superficie, sin disgregarlo. Descartar el líquido.
- Si el pellet continúa sucio, agregar 10 mL de TBS 1X. Tapar y agitar suavemente para disgregar el pellet. Centrifugar (sin tapar) a 2500 rpm por 5 min.

DIGESTIÓN

- Agregar 3 mL 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 3 mL de solución de Proteinasa K traslúcida. Antes de usar la solución PK 1X, 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, durante toda la noche (overnight).

TRATAMIENTO POST-DIGESTIÓN

- Chequear que el contenido de todos los tubos esté translúcido, sin grumos o restos de pellet sin digerir.
- Si alguna muestra no está totalmente digerida, agregar 3 mL de solución PK 1X, y volver a incubarla a 50 °C hasta que esté translúcida, para poder continuar con el protocolo.

TRATAMIENTO CON SAL (SALTING)

- Agregar 3 mL de solución de NaCl saturado (6M), y tapar los tubos nuevamente con las tapas correspondientes.
- Agitar vigorosamente en las gradillas por 1 min.
- Remover las tapas y centrifugar a 2000 rpm por 10 min. El pellet de sal debe ser evidente y el sobrenadante debe ser casi transparente. En caso contrario (si no se observa pellet o el sobrenadante está turbio), agitar vigorosamente por 1 min y volver a centrifugar a 2000 por 15 min.

PRECIPITACIÓN DEL ADN

- Verter el sobrenadante cuidadosamente (ya que contiene el ADN) en tubos Falcon de 50 mL, con 20 mL de etanol 95%, sin dejar caer el pellet de sal.

- Tapar los tubos con parafilm e invertir gentilmente varias veces, para precipitar el ADN.

REMOCIÓN DEL ADN

- Pescar el ADN con pipetas Pasteur estériles y sumergirlo en etanol 70% (usar un vaso de Bohemia y cambiar el etanol regularmente).
- Quitar el exceso de etanol del ADN sobre una toalla de papel y transferir el ADN a un tubo Eppendorf vacío de 1,5 mL, rotulado con el número correspondiente.
- Dejar semiabiertos los tubos (cubiertos con una toalla de papel), para permitir evaporar el etanol
- Una vez evaporado el etanol, agregar 1 mL de TE 1X estéril (en caso de haber partido de 10 mL de sangre entera) y dejar en heladera durante 1 semana para la completa resuspensión del ADN.

ANEXO 1 (CONTINUACIÓN). TÉCNICAS EMPLEADAS PARA LA EXTRACCIÓN DE ADN**EXTRACCIÓN DE ADN GENÓMICO A PARTIR DE SANGRE ENTERA CON ACETATO DE POTASIO**

Animal Genomics, AgResearch Invermay, NZ, Abril 2008

Esta técnica se empleó en Galgos, Pastores Alemanes y Dobermann.

Paso 1

- Invertir suavemente la muestra de sangre, controlando que no tenga coágulos. En caso de haber alguno, “pescarlo” con una pipeta Pasteur de plástico y descartarlo.
- Colocar la muestra de sangre (10 mL, aproximadamente) en tubos Falcon de 50 mL rotulados.
- Agregar 20 mL de SLGR (solución de lisis de glóbulos rojos) 1X (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 min.
- Descartar el sobrenadante.

Paso 2

- Agregar 10 mL 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 una pipeta Pasteur de plástico y descartarlo.
- Centrifugar (sin tapar) a 2500 rpm por 5 min.
- Descartar el sobrenadante e invertir los tubos sobre papel para quitar el exceso de líquido del pellet.

Paso 3

- Agregar 10 mL de TBS 1X . Tapar y agitar suavemente para disgregar el pellet.
- Centrifugar (sin tapar) a 2500 rpm por 5 min.
- Descartar el sobrenadante e invertir los tubos sobre papel para quitar el exceso de líquido del pellet.

- El pellet debe quedar blanco. Si estuviera rojo (o rosado en la superficie), agregar TBS 1X suavemente con una pipeta Pasteur para lavar su superficie, sin disgregarlo. Descartar el líquido.
- Si el pellet continúa sucio, agregar 10 mL de TBS 1X. Tapar y agitar suavemente para disgregar el pellet. Centrifugar (sin tapar) a 2500 rpm por 5 min.

Paso 4

- Agregar 3 mL 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 3 mL de solución de Proteinasa K traslúcida. Antes de usar la solución PK 1X, 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, durante toda la noche (overnight).

Paso 5

- Añadir 300 ul de solución de Acetato de Potasio (3 M) a la muestra digerida y se invierta varias veces para mezclar bien.
- Incubar a - 20 ° C durante 10 min.
- Centrifugar a 14.000 rpm durante 10 minutos.

Paso 6

- Transferir el sobrenadante a un nuevo tubo.
- Añadir 500 ul de isopropanol y mezclar el tubo para precipitar el ADN.
- Incubar a - 20 ° C durante 10 min (para maximizar la precipitación de ADN).
- Centrifugar a 14.000 rpm durante 15 min

Paso 7

- Verter el sobrenadante y añadir 600 ul de etanol (70%) para lavar el sedimento.
- Centrifugar durante 10 min a alta velocidad

Paso 8

- Verter cuidadosamente el etanol y secar el pellet durante 5 a 10 min.
- Resuspender el sedimento de ADN en 200-300 ul de Tris (10 mM, pH: 8,0)
- Calentar las muestras a 65 ° C durante aproximadamente 1 h.
- Mezclar bien para resuspender el DNA.

ANEXO 2. RESULTADOS DE CONCENTRACIÓN Y PUREZA DEL ADN OBTENIDO, MEDIDO EN EL NANODROP ND1000 (LABORATORIO DE TÉCNICAS NUCLEARES)

a. Raza Ovejero Alemán

Muestra	Lectura a 280nm (ADN)	Relación 260/280 (pureza)
OA1	324,5	1,84
OA2	419,7	1,81
OA3	126,3	1,59
OA4	175,4	1,89
OA5	107,9	1,88
OA6	345,2	1,73
OA7	225,2	1,85
OA8	264,4	1,86
OA9	139	1,88
OA10	158,8	1,92
OA11	248,8	1,85
OA12	331,5	1,84
OA13	249,1	1,88
OA14	50,4	1,73
OA15	51,9	2,02
OA16	100,1	1,81
OA17	271,4	1,87
OA18	138,5	1,74
OA19	73,8	1,92
OA20	158,2	1,92
OA21	30,2	1,63
OA22	241,5	1,38
OA23	122,1	1,62
OA24	526,3	1,78
OA25	70,5	1,82
OA26	67,4	1,50
OA27	49,7	1,80
OA28	6,9	1,12
OA29	3,2	1,02
OA30	215,1	1,82
OA31	103,5	1,78
OA32	64,8	1,84
OA33	39,2	1,61
OA34	50,4	1,85

ANEXO 2 (CONTINUACIÓN). RESULTADOS DE CONCENTRACIÓN Y PUREZA DEL ADN OBTENIDO, MEDIDO EN EL NANODROP ND1000 (LABORATORIO DE TÉCNICAS NUCLEARES)

b. Raza Dobermann

Muestra	Lectura a 280nm (ADN)	Relación 260/280 (pureza)
D1	409,1	1,81
D2	559,7	1,76
D3	165,1	1,87
D4	122,6	1,45
D5	42,2	1,75
D6	310,7	1,86
D7	174,3	1,86
D8	317,8	1,87
D9	65,4	1,95
D10	172,6	1,88
D11	222,5	1,88
D12	204	1,88
D13	161,2	1,89
D14	79,7	1,86
D15	101,9	1,94
D16	2963,7	1,71
D17	83,9	1,83
D18	60,4	1,76
D19	56,7	1,85
D20	153,2	1,87
D21	85,9	1,82
D22	103,8	1,84
D23	61,5	1,74
D24	56,5	1,88
D25	30,9	1,78
D26	27,5	1,84
D27	147,9	2,01
D28	27,5	1,65
D29	24,9	1,70
D30	31,6	1,71
D31	19	1,65

ANEXO 2 (CONTINUACIÓN). RESULTADOS DE CONCENTRACIÓN Y PUREZA DEL ADN OBTENIDO, MEDIDO EN EL NANODROP ND1000 (LABORATORIO DE TÉCNICAS NUCLEARES)

c. Raza Galgo

Muestra	Lectura a 280nm (ADN)	Relación 260/280 (pureza)
G1	26,2	2,79
G2	55,3	1,91
G3	58,5	2,04
G4	55,9	1,99
G5	56,0	1,97
G6	43,7	1,91
G7	49,9	1,92
G8	1628,7	1,81
G9	197,4	1,86
G10	132,9	1,87
G11	114,3	1,83
G12	50,0	1,86
G13	71,8	1,88
G14	106,7	1,89
G15	66,2	1,87
G16	76,0	1,91
G17	73,7	1,75
G18	35,8	1,76
G19	4,9	1,29
G20	21,0	1,52
G21	15,5	1,67
G22	8,0	1,01
G23	71,2	1,63
G24	23,1	1,96
G25	22,8	1,71

ANEXO 2 (CONTINUACIÓN). RESULTADOS DE CONCENTRACIÓN Y PUREZA DEL ADN OBTENIDO, MEDIDO EN EL NANODROP ND1000 (LABORATORIO DE TÉCNICAS NUCLEARES)

d. Raza Border Collie

Muestra	Lectura a 280nm (ADN)	Relación 260/280 (pureza)
1	18,2	1,23
2	16,0	1,33
3	59,7	1,43
4	264,4	1,8
5	153,2	1,73
6	4,2	2,17
7	8,6	2,88
8	4,5	2,86
9	12,8	2,5
10	6,8	3,94
11	13,7	1,38
12	72,5	1,26
13	21,7	1,70
14	100,7	1,81
15	22,7	1,44
16	22,4	1,32
17	51,9	1,62
18	16,4	1,51
19	10,8	1,27
20	8,9	1,35
21	13,7	3,25
22	26,6	1,84
23	24,4	1,29
24	286,0	1,84
25	89,2	1,25

ANEXO 3. RESULTADOS DEL GENOTIPADO PARA LA MUTACIÓN *MDR1-1Δ*.

a. Raza Ovejero Alemán

Muestra	mdr1-1	mdr1-2
OA1	AGAT	AGAT
OA2	AGAT	AGAT
OA 3		
OA4	AGAT	AGAT
OA5	AGAT	AGAT
OA6	AGAT	AGAT
OA7	AGAT	AGAT
OA8	AGAT	AGAT
OA 9	AGAT	AGAT
OA 10	AGAT	AGAT
OA 11	AGAT	AGAT
OA 12	AGAT	AGAT
OA 13	AGAT	AGAT
OA 14R	AGAT	AGAT
OA 15	AGAT	AGAT
OA 16	AGAT	AGAT
OA 17	AGAT	AGAT
OA 18	AGAT	AGAT
OA 19	AGAT	AGAT
OA 20	AGAT	AGAT
OA 21R	AGAT	AGAT
OA 22	AGAT	AGAT
OA 23	AGAT	AGAT
OA 24	AGAT	AGAT
OA 25	AGAT	AGAT
OA 26	AGAT	AGAT
OA 27	AGAT	AGAT
OA 28	AGAT	AGAT
OA 29	AGAT	AGAT
OA 30	AGAT	AGAT
OA 31	AGAT	AGAT
OA 32	AGAT	AGAT
OA 33	AGAT	AGAT
OA 34	AGAT	AGAT

A las muestras que sigue una R luego de su número de laboratorio, hubo que repetirlas para poder tener el resultado del genotipo.

ANEXO 3 (CONTINUACIÓN). RESULTADOS DEL GENOTIPADO PARA LA MUTACIÓN *MDR1-1Δ*.

b. Raza Dobermann

Muestra	mdr1-1	mdr1-2
D1	AGAT	AGAT
D2	AGAT	AGAT
D 3	AGAT	AGAT
D 4R	AGAT	AGAT
D 5R	AGAT	AGAT
D 6	AGAT	AGAT
D 7	AGAT	AGAT
D 8	AGAT	AGAT
D 9	AGAT	AGAT
D 10	AGAT	AGAT
D 11	AGAT	AGAT
D 12	AGAT	AGAT
D 13	AGAT	AGAT
D 14R	AGAT	AGAT
D 15	AGAT	AGAT
D 16R	AGAT	AGAT
D 17	AGAT	AGAT
D 18	AGAT	AGAT
D 19	AGAT	AGAT
D 20	AGAT	AGAT
D 21	AGAT	AGAT
D 22	AGAT	AGAT
D 23	AGAT	AGAT
D 24R	AGAT	AGAT
D 25R	AGAT	AGAT
D 26R	AGAT	AGAT
D 27		
D 28R	AGAT	AGAT
D 29	AGAT	AGAT
D 30	AGAT	AGAT
D 31	AGAT	AGAT

A las muestras que sigue una R luego de su número de laboratorio, hubo que repetir las para poder tener el resultado del genotipo.

ANEXO 3 (CONTINUACIÓN). RESULTADOS DEL GENOTIPADO PARA LA MUTACIÓN *MDR1-1Δ*.

c. Raza Galgo

Muestra	mdr1-1	mdr1-2
G1	AGAT	AGAT
G10	AGAT	AGAT
G11	AGAT	AGAT
G12	AGAT	AGAT
G13	AGAT	AGAT
G14	AGAT	AGAT
G15	AGAT	AGAT
G16	AGAT	AGAT
G17	AGAT	AGAT
G18	AGAT	AGAT
G2	AGAT	AGAT
G20	AGAT	AGAT
G21	AGAT	AGAT
G23	AGAT	AGAT
G24	AGAT	AGAT
G25	AGAT	AGAT
G3	AGAT	AGAT
G4	AGAT	AGAT
G5	AGAT	AGAT
G6	AGAT	AGAT
G7	AGAT	AGAT
G8	AGAT	AGAT
G9	AGAT	AGAT

ANEXO 3 (CONTINUACIÓN). RESULTADOS DEL GENOTIPADO PARA LA MUTACIÓN *MDR1-1Δ*.

d. Raza Border Collie

Muestra	mdr1-1	mdr1-2
1	AGAT	AGAT
12	AGAT	AGAT
13		
14		
15		
16		
17		
18		
2	AGAT	AGAT
21		
22	AGAT	AGAT
23	AGAT	AGAT
24	AGAT	AGAT
25		
3	AGAT	AGAT
4	AGAT	AGAT
5	AGAT	AGAT
9		

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS (CAPÍTULO 1)

- Bissonnette S, Paradis M, Daneau I, Silversides D. (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. *Veterinary Dermatology* 18: 60-66
- Dean M, Rzhetsky A, Allikmets R. (2001) The Human ATP-Binding Cassette (ABC) Transporter Superfamily. *Genome Res.* 11: 1156-1166
- Dowling P. (2006) Pharmacogenetics: It's not just about ivermectin in collies. *CVJ* 47: 1165-1168
- Fleischer S, Sharkey M, Mealey K, Ostrander E, Martinez M. (2008) Pharmacogenetic and Metabolic Differences Between Dog Breeds: Their Impact on Canine Medicine and the Use of the Dog as a Preclinical Animal Model. *The AAPS Journal* 10: 110-119
- Gagliardi R. (2009) Estudios genéticos en caninos de raza Cimarrón Uruguayo (*Canis familiaris*). Tesis de Maestría en Ciencias Biológicas, sub-área Genética. PEDECIBA
- 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.
- Geyer J, Döring B, Godoy J, 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
- Gibney ER, Nolan CM. (2010) Epigenetics and gene expression. *Heredity* 105: 4–13.
- 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.
- Hopkins K, Marcella K, Strecker A. (1990) Ivermectin toxicosis in a dog. *J Am Vet Med Assoc* 197:93-94.

- Lifschitz A, Virkel G, Imperiale F, Pis A, Lanusse C. Fármacos endectocidas: Avermectinas y milbemicinas. Pp 545-558. En Botana L, Landoni F, Martín-Jiménez T. Farmacología y Terapéutica Veterinaria, pp 734. Editorial: Mc Graw-Hill/Interamericana de España. ISBN-84-486-0471-7
- Llambí S, Gagliardi R. (2013) Conociendo al perro cimarrón uruguayo. Pp 102 Editorial: bibliotecaplural. ISBN-978-9974-0-0996-7
- Maitra R, Halpin P, Karlson K, Page R, Paik D, Leavitt M, Moyer B, Stanton B, Hamilton J. (2001) Different effects of mitomycin C and doxorubicin on P-glycoprotein expression. Biochem. J. 355: 617-624
- Mealey K, Bentjen S, Gay J, Cantor G. (2001) Ivermectin sensitivity in collies is associated with a deletion mutation of the *mdr1* gene. Pharmacogenetics 11: 727-733
- Mealey K. (2006) Pharmacogenetics. Vet. Clin. Small Anim. 36: 961-973
- Mizukami K, Chang H-S, Yabuki A, Kawamichi T, Hossain M, Rahman M, Uddin M, Yamato O (2012) Rapid genotyping assays for the 4–base pair deletion of canine MDR1/ABCB1 gene and low frequency of the mutant allele in Border Collie dogs. Journal of Veterinary Diagnostic Investigation 24: 127 –134
- Morris D. (2007) Razas de Perros, Barcelona, Editorial: Omega, 768p. ISBN-9788428213059
- Neff M, Robertson K, Wong A, Safra N, Broman K, Slatkin M, Mealey K, Pedersen N. (2004) Breed distribution and history of canine *mdr1-1Δ*, a pharmacogenetic mutation that marks the emergence of breeds from the collie lineage. PNAS 101: 11725-11730
- Tomiyasu H, Goto-Koshino Y, Fujino Y, Ohno K, Tsujimoto H. (2014) Epigenetic regulation of the ABCB1 gene in drug-sensitive and drug-resistant lymphoid tumour cell lines obtained from canine patients. The Veterinary Journal 199: 103-109
- Wu Q, Yang Z, Nie Y, Shi Y, Fan. (2014) D.Multi-drug resistance in cancer chemotherapeutics: Mechanisms and lab approaches Cancer Letters 347: 159–166
- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/mapview/>

- <http://www.ensembl.org/index.html>
- <http://www.es.wikipedia.org/wiki/Dobermann>
- www.fci.be
- http://es.wikipedia.org/wiki/Pastor_aleman
- <http://www.pastorblancosuizo.net/inicio.php?page=raza>
- <http://www.es.wikipedia.org/wiki/Dobermann>

Direcciones de imágenes

- <http://piel-l.org/libreria/wp-content/uploads/2010/12/ivermectina-graf.gif>
- http://es.wikipedia.org/wiki/Pastor_blanco_suizo

CAPÍTULO 2. ANÁLISIS DE LOS EXONES 6 Y 7 DEL GEN *CYP2D15* EN PERROS CIMARRONES

INTRODUCCIÓN

Los fármacos administrados a un individuo son bio-transformados en diferentes tejidos del organismo pese a lo cual, los procesos enzimáticos que ocurren en el hígado son los mayores responsables de que se de la transformación bioquímica de los mismos. Las sustancias más lipófilas son las que entran con mayor facilidad a la célula, donde se dan estos procesos. Esta transformación da como resultado sustancias más polares (hidrófilas, solubles en agua) que la original, lo que hace que se eliminen con más facilidad por vía renal o biliar. En general, estos metabolitos producidos suelen tener menor actividad farmacológica que el fármaco original. Pese a esto, se conocen casos donde ocurre lo contrario. Estos casos son las drogas que se administran como pro fármacos y que luego de pasar por el metabolismo hepático se transforman en fármacos activos. En resumen, el metabolismo hepático puede lograr:

- a. Inactivar metabolitos (warfarina, fenitoína).
- b. Activar pro-fármacos transformándolos en fármacos activos (codeína, tramadol, enalapril).
- c. Generar metabolitos tóxicos (acetaminofeno).

El metabolismo hepático se da en dos fases que pueden, o no, ser consecutivas.

Fase I. En esta fase actúan las enzimas microsomales hepáticas, fundamentalmente las monooxigenasas parte de la superfamilia del **citocromo P450**. Lo que suelen hacer estas enzimas es añadir radicales polares (oxidación, reducción, hidrólisis) a las moléculas del fármaco y eliminan grupos no polares. Los metabolitos resultantes se eliminan por vía biliar o renal ó continúan siendo transformados por las enzimas encargadas del metabolismo en fase II (Orellana&Guajardo, 2004; Martín-Jiménez 2002).

Fase II. En esta fase intervienen una serie de transferasas. Se dan reacciones de conjugación donde el fármaco original ó los metabolitos mencionados en el punto anterior se unen a sustratos polares endógenos, facilitándose su posterior eliminación por vía renal o biliar (Orellana&Guajardo, 2004; Martín-Jiménez, 2002).

Metabolismo de Fármacos: Citocromo P450

El citocromo P450 es el principal sistema enzimático responsable de la biotransformación de fármacos de fase I en el organismo animal. En humanos, también se la considera la superfamilia más importante respecto a lo que a metabolismo de fármacos se refiere (Nishimuta *et al.*, 2013). Esta familia está muy conservada entre diferentes especies. Se cree que deriva de un único gen ancestral hace aproximadamente 1,36 billones de años. Aunque todos los miembros de esta superfamilia poseen regiones muy conservadas de residuos aminoacídicos, hay relativamente poca diferencia en la secuencia primaria de aminoácidos entre diferentes especies. Sin embargo, estas pocas diferencias son causantes de grandes diferencias en lo que se refiere a los sustratos y a la actividad catalítica de las enzimas, llevando a las diferencias existentes en el metabolismo farmacológico en las distintas especies (Martignoni *et al.*, 2006).

Estas enzimas se expresan en numerosos tejidos corporales entre los que se encuentran hígado, riñón, piel y pulmones. La función original de esta superfamilia, sin considerar la transformación de fármacos, es metabolizar sustancias endógenas como ser esteroides y prostaglandinas. Por lo tanto, las enzimas del P450 intervienen en el metabolismo de diferentes sustancias de origen exógeno como ser drogas (fármacos, xenobióticos), pesticidas, procarcinógenos, anestésicos, solventes orgánicos, etc; y también de sustratos de origen endógeno como el colesterol, ácidos biliares, hormonas esteroideas, ácidos grasos. La ubicación en concreto de las enzimas en la célula es en la mitocondria y en distintas membranas celulares, siendo muy abundante en el retículo endoplásmico liso (Orellana&Guajardo, 2004).

Existen diversas drogas capaces de inducir su actividad, dado que son sustrato de enzimas de esta superfamilia. En algunos casos, más de una droga tiene afinidad por la misma enzima CYP. En estos casos puede darse una interacción medicamentosa. La interferencia puede darse si las dos sustancias compiten por el mismo punto de acción (inhibición competitiva) ó puede unirse a otro sitio pero de tal forma que altera la estructura de la enzima (inhibición no competitiva). Finalmente, un inhibidor puede generar un metabolito que se una irreversiblemente a la enzima terminando con su función (inhibición "suicida"). Por otro lado, existen sustancias que inducen a los componentes del citocromo P450. Estos inductores se unen a receptores nucleares específicos que se asocian con elementos de respuesta a fármacos en las regiones promotoras de genes CYP determinados. Esto lleva a una activación transcripcional del gen generando una mayor expresión de la enzima en cuestión y, por lo tanto, un

aumento en su actividad. Algunas drogas inductoras de CYP son el fenobarbital y el omeprazol (Trepanier, 2006).

El hígado es el principal órgano de metabolismo de fármacos y es donde se expresa la mayoría de las enzimas del citocromo P450. Sin embargo, existen otros tejidos, principalmente donde se dan absorción y eliminación de fármacos, donde también hay metabolismo. Ejemplos de estos casos son la mucosa intestinal donde se metabolizan ciertos fármacos administrados por vía oral; la piel que metaboliza fármacos empleados por vía tópica; los pulmones capaces de metabolizar sustancias que ingresan por vía aérea; incluso el cerebro, riñón y glándulas adrenales. En estos tejidos también podemos encontrar que se expresan enzimas de la superfamilia del citocromo P450 (Trepanier, 2006; Martín-Jiménez, 2002).

Las integrantes de la superfamilia CYP450 son enzimas que contienen un grupo hemo que incluye átomos de hierro. Además de ser responsables de metabolizar fármacos, como se mencionó previamente, metabolizan sustancias endógenas y también químicos ambientales. Actualmente hay cientos de enzimas CYP reconocidas, lo que ha llevado a que se caractericen de cierta forma: El primer número hace referencia a la familia, la letra en mayúscula refiere a la subfamilia y el número final a la enzima particular, precedidos todos por *CYP*. Por ejemplo *CYP2E1*: CYP2 corresponde a la familia 2, 2E corresponde a la subfamilia, 2E1 es la enzima particular. El que una enzima pertenezca a una familia u otra depende de su homología estructural deducida a partir de los cADNs. Las proteínas CYP que presentan más del 40% de homología en su secuencia, pertenecen a la misma familia; mientras que las isoformas que presentan un mínimo del 55% de identidad son incluidas en la misma subfamilia. En mamíferos se ha descrito un mínimo de 17 familias (Orellana&Guajardo, 2004). Aunque se da este factor, la mayoría de las enzimas del citocromo P450 poseen regiones muy conservadas de residuos aminoacídicos, cambios menores en la secuencia de aminoácidos pueden ser responsables de grandes diferencias en la especificidad de sustrato y en la actividad catalítica de cada una de ellas (Nishimuta *et al.*, 2013).

La información existente sobre esta superfamilia en perros, es mucho más escasa de la que existe en humanos; mucho menor aún es en otras especies de interés veterinario. A este factor, se suman los antecedentes, en humanos, que hablan de la asociación existente entre las enzimas del citocromo P450 y determinadas enfermedades (Trepanier, 2006; Orellana&Guajardo, 2004).

En lo que respecta a la superfamilia del citocromo P450, como ya se mencionó, existen grandes similitudes en las secuencias aminoacídicas de las diferentes enzimas. Sucede lo mismo entre diferentes especies, donde los genes que codifican para estas enzimas son conservados. Pese a estos factores, hay autores que recomiendan, en estos casos, estudiar lo que sucede en cada especie por separado, inclusive la humana. Esto se debe a lo ya mencionado, la presencia de cambios menores en una secuencia aminoacídica ya implica una gran diferencia en lo que respecta al sustrato de estas enzimas y a su actividad. En este caso, es necesario tener cuidado al extrapolar datos entre especies diferentes (Nishimuta *et al.*, 2013; Orellana&Guajardo, 2004).

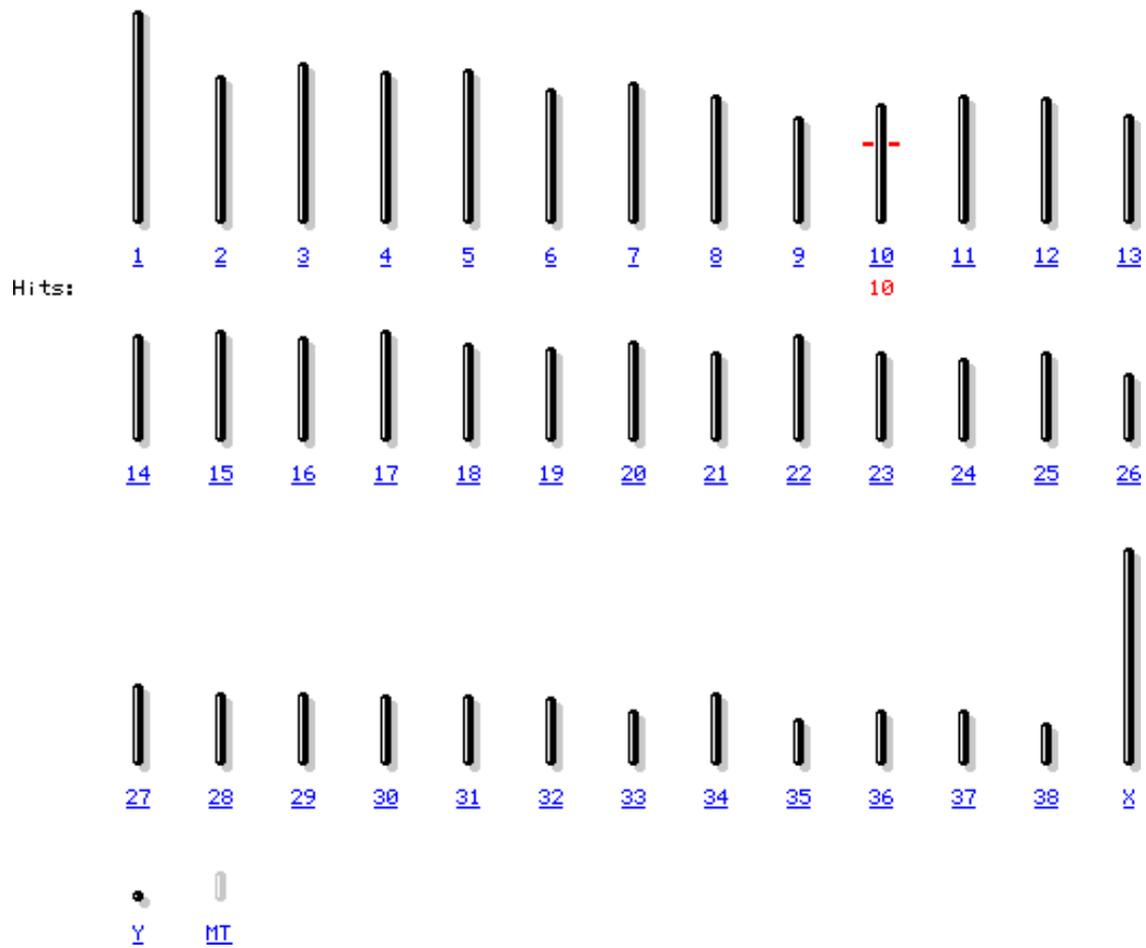
A pesar de la existencia de estas diferencias, los modelos animales son usados comúnmente en el desarrollo de nuevas drogas para predecir el comportamiento que pueden presentar en humanos. Aunque la validez de estos estudios en animales con el fin de extrapolar los resultados a humanos ha sido cuestionada, se considera que los datos de farmacocinética pueden extrapolarse razonablemente bien, siempre y cuando se tomen en cuenta los principios farmacocinéticos adecuados (Martignoni *et al.*, 2006).

El gen *CYP2D15*

El gen *CYP2D15* es el ortólogo canino del gen *CYP2D6* humano. La proteína codificada por este gen es responsable de metabolizar gran número de drogas de importancia en Medicina humana: Betabloqueantes (propranolol, timolol, metoprolol), antiarrítmicos (quinidina, flecainida), antidepresivos (amitriptilina, clomipramina, fluoxetina, imipramina), antieméticos (clorpromazina, metoclopramida) y opioides (codeína, dextrometorfan, tramadol). En la tabla 3.1 (en el capítulo siguiente) se muestran drogas metabolizadas por distintas enzimas CYP. Las drogas metabolizadas por *CYP2D15* incluyen propranolol, dextrometorfano e imipramina. En este caso se ve uno de los ejemplos de la razón por la cual es difícil extrapolar datos entre animales y humanos: Celecoxib es sustrato de *CYP2D15* mientras que en humanos, se asocia más con la familia *CYP2C* (Trepanier, 2006). Para el exón 7 del gen *CYP2D15*, se han descrito diferentes mutaciones en diversas razas caninas (Rodríguez, 2011). En la raza Cimarrón Uruguayo no hay estudios previos para este gen (Gagliardi *et al.*, 2011).

En la figura 2.1 se muestra la ubicación del gen en el cromosoma 10 (MapView: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/mapview/>) y a continuación se representa el gen con sus exones e intrones.

(a)



(b)

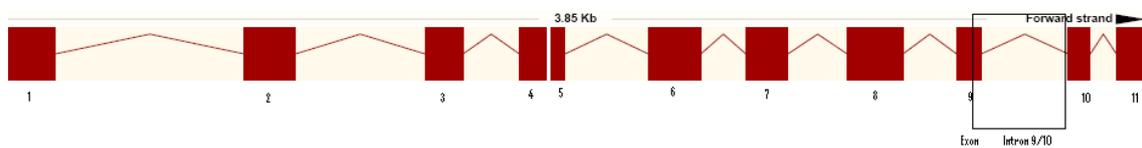


Figura 2.1. a. Ubicación del gen *CYP2D15* en el idiograma canino (búsqueda realizada en MapViewer). b. Esquema del gen *CYP2D15* (exones e intrones) (Rodríguez, 2011).

El perro Cimarrón Uruguayo



Cimarrón (<http://www.wordreference.com/definicion/cimarr%F3n>)

1. adj. y s. [Animal] doméstico que se hace salvaje: perro cimarrón.
2. amer. [Esclavo] fugitivo que se refugiaba en los montes en busca de la libertad.

Cimarrón, na. (<http://buscon.rae.es/>) (De cima).

1. adj. Mar. Dicho de un marinero: Indolente y poco trabajador. U. t. c. s.
2. adj. Am. Dicho de un animal doméstico: Que huye al campo y se hace montaraz.
3. adj. Am. Dicho de un animal: Salvaje, no domesticado.
4. adj. Am. Dicho de una planta silvestre: De cuyo nombre o especie hay otra cultivada.
5. adj. Am. Se decía del esclavo que se refugiaba en los montes buscando la libertad. Era u. t. c. s.
6. m. Arg. y Ur. Mate amargo.

Plantas, animales e incluso, hombre, en América se les llamaba “*cimarrones*”, cuando habían sido domésticos y luego volvían al estado salvaje. A quienes, en primera instancia, se aplicó el término cimarrón fueron:

- Marineros que desertaban.
- Esclavos que huían de los barcos hacia las cimas o montes de las zonas serranas de las islas y costas del Caribe.

Luego se aplicó a:

- Animales domésticos que escapaban del cautiverio o domesticación.
- Plantas importadas que germinaban y se reproducían espontáneamente sin haber sido sembradas intencionalmente.

En la zona del Río de la Plata, el cimarrón más conocido es el perro (Assunção, 1997).

Origen del perro Cimarrón Uruguayo

Según ciertas evidencias arqueológicas e históricas, existieron perros previo a la llegada de Colón a América. A esto se suman los términos indígenas que están emparentados onomatopéyicamente con el ladrido; yaguá para los guaraníes, chtreguá para los araucanos. Incluso en el Diario del primer viaje de Colón se encuentran evidencias de la existencia de perros. Pese a estos datos, se considera que el perro Cimarrón no descendería de estos animales, sino que descende de mastines y lebreles (perros de guerra y montería) traídos por los colonizadores y conquistadores. Los mastines vinieron ya en el primer viaje de Colón como animales de combate, llevando incluso armaduras. En España se usaban en caza mayor como la del oso, lobo y jabalí, y como pastores. Eran animales braquimorfos, de cráneo grande y ancho, hocico mediano, pecho ancho y costillar bien amplio, grupa ligeramente más alta que la cruz o igual, orejas grandes semi-caídas. El tamaño de mediano a grande. Predominantemente se trataba de animales bayos con extremos distales negros aunque, en ocasiones, había animales atigrados, negros, y manchados de blanco y negro, o castaño. Respecto de los lebreles (Galgos Españoles), se usaban principalmente para la caza de ciervos y liebres. En aquella época, el Galgo Español era un perro dolicomorfo, de cráneo mediano y hocico fino y largo, orejas levantadas o semi-dobladas, patas fuertes y enjutas, lomo casi horizontal, cola mediana fina, muy ágiles en la carrera y vivaces en el ataque de presa. Su pelo era corto, de colores variados, generalmente bayos y rojizos atigrados ó agrisados o negros. Estos animales vinieron en los viajes de Colón y también vinieron con Cortés en Méjico, don

Pedro de Mendoza, Cabeza de Vaca, Ortiz de Zárate, los hermanos Gois y los siguientes conquistadores y colonos (Assunção, 1997).

Historia del perro Cimarrón Uruguayo

Dice Artigas: “Que le había de hacer la guerra eternamente, y quando le faltasen hombres (horresco referens) había de criar perros cimarrones para acabar con los porteños.” Frase al Diario “El Censor”, según Assunção, 1997.

Esta frase de Artigas no pasó de ser simbólica, dada la agresividad de estos perros. Estos animales atacaban al ganado y a las personas, siendo un problema que ya se daba en el viejo continente antes del descubrimiento de América. En la región de la Banda Oriental, los perros fueron un serio peligro al separarse del hombre una vez que hubo abundancia de ganados en la campaña y que faltaba un hogar fijo o sedentario a sus dueños. Hay historiadores que en el siglo XVI ya hablan de su multiplicación y de los destrozos que producían, poniéndose incluso precio a sus cabezas. A mediados de 1788 se aprobó el exterminio de los perros cimarrones en el Cabildo de Buenos Aires. Tenían que remitirse las mandíbulas y las quijadas para llevar un control del número de perros que se mataban y también había que matar a los perros domésticos de manera que el número de animales por establecimiento fuera limitado. En 1795 se aprueba la primer “batida” en el margen oriental del Uruguay. En el siglo XIX todavía se seguía con las persecuciones a los perros cimarrones. A principios de ese siglo, en una sola batida, comandada por Artigas llegan a matarse trece mil perros, quedando “gran cantidad de madres con su prole, que ganaron los montes del Olimar y sobre todo en la Sierra de Otazo y en los Cerros Largos”. Un segundo período en el que los perros cimarrones representaron un problema fue durante la Guerra Grande. En este entonces, se dio nuevamente una persecución de los perros cimarrones. Aquí sí, se llegó prácticamente a la desaparición del perro cimarrón, primero con ayuda de veneno y posteriormente con el alambrado de los campos y la sedentarización lograda por la cría y engorde del ganado. Sin embargo, quedan unos pocos ejemplares en lugares agrestes, en los departamentos de Cerro Largo y Treinta y Tres (Assunção, 1997; Silva Valdés, 1957).

Desde el año 2011, la raza “Cimarrón Uruguayo” es reconocida como tal. Pese a este nombre, no se puede dejar de considerar a quien tradicionalmente ha sido considerado como:

- **Perro “Criollo”:** “Descendiente de extranjeros pero nacido en las regiones del Plata.”
- **Perro “Gaucha”:** “Por libre y autosuficiente.”
- **Perro “Cimarrón”:** “Por el asilvestramiento.”

El perro Cimarrón en la actualidad

El 12 de octubre de 1988 se funda la Sociedad de Criadores de Cimarrones con el fin de recuperar y preservar la raza. En ese momento también se redacta el estándar racial y se tramita su reconocimiento por el Kennel Club Uruguayo (KCU). En febrero de 2006 la Federación Cinológica Internacional reconoce primariamente al perro Cimarrón Uruguayo como raza, habiendo sido reconocido definitivamente a principios de 2011. Estos puntos han llevado a que el interés de criadores y expositores en la raza se vea aumentado, lo que ha causado que se realicen diferentes estudios con el fin de conocer en que situación se encuentra la misma. Trabajos de relevamiento de datos revelan que en la ciudad, la mayoría de estos animales se emplean como animales de compañía, guarda y caza mientras que en el medio rural se emplean para trabajar con ganado, particularmente ganado mayor (Silveira *et al.*, 2002). A partir del 1 de enero de 2007, animales con un diagnóstico grave de displasia de cadera, no se consideran aptos para la cría. El interés que han ido despertando estos animales se ve reflejado también en el aumento del número de animales inscriptos en el KCU, mientras que en octubre de 1997 estaban inscriptos novecientos treinta animales, actualmente hay más de 6000 (Silveira *et al.*, 1998; <http://www.kcu.com.uy>).

Estándar racial

El Cimarrón Uruguayo es un perro de tipo moloso, talla mediana, fuerte, compacto, con buena osatura, musculoso y ágil. Según la clasificación de la Federación Cinológica Internacional, se encuentra dentro del grupo 2: Perros tipo pinschers, schnauzers, molosoides, perros tipo montaña y boyeros Suizos, en la sección 2.1: Molosoides, tipo dogo. Sin prueba de trabajo. Son animales de carácter equilibrado, sagaz y de gran coraje. Son animales excelentes para el trabajo con ganado, caza mayor y guardia. La cabeza es de forma troncopiramidal, siendo el cráneo más ancho

que largo. El stop es moderado y el hocico moderadamente ancho, no más largo que el cráneo. Los ojos deben ser marrones, cuanto más oscuros mejor, los párpados deben ser totalmente pigmentados. Las orejas deben presentar implantación media, pueden cortarse en forma redondeada, semejando la oreja de puma. La mordida debe ser en tijera aunque no se descalifican los animales que la presentan en pinza. El pecho es profundo, ancho y bien desarrollado. El tronco es compacto, profundo, de lomo recto o algo ensillado. La grupa es de buen largo y ancha, con una inclinación de 30 grados respecto a la horizontal. La cola presenta implantación media, su largo debe llegar al garrón, debiendo presentar un porte bajo cuando está en reposo y horizontal o levemente hacia arriba cuando está en movimiento. El pelo debe ser corto, liso, pegado al cuerpo y con subpelo. Pueden ser de color atigrado o bayo en todas sus tonalidades, con o sin máscara. Se permiten manchas blancas en maxilar inferior, zona inferior del cuello, antepecho, vientre y parte baja de los miembros. Los machos pesan de 38 a 45 kg y las hembras de 33 a 40 kg. Los machos deben tener dos testículos de apariencia normal completamente descendidos en el escroto. Se consideran faltas las desviaciones de los elementos mencionados anteriormente. La gravedad se considera según el grado de desviación del estándar y los efectos que presente sobre la salud y el bienestar del animal (<http://www.kcu.com.uy>).

OBJETIVOS**OBJETIVO GENERAL**

Estudiar el gen *CYP2D15* en la raza canina Cimarrón Uruguayo.

OBJETIVOS PARTICULARES

- Analizar las secuencias de los exones 6 y 7 del gen *CYP2D15* en perros cimarrones.
- Comparar las secuencias obtenidas entre los diferentes animales.

HIPÓTESIS

Entre los diferentes perros de raza Cimarrón Uruguayo estudiados, existen polimorfismos en la secuencia de los exones 6 y 7 del gen *CYP2D15*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Muestra estudiada

Se estudiaron 26 muestras para el exón 7 del gen *CYP2D15* y 10 muestras para el exón 6 de caninos de raza Cimarrón Uruguayo. Se extrajeron muestras sanguíneas de las venas anterobraquial o safena, en condiciones de asepsia. Se empleó como anticoagulante EDTA potásico. Las muestras se conservaron refrigeradas hasta su procesamiento en el laboratorio (Área Genética de Facultad de Veterinaria). La toma de las muestras sanguíneas implicó un stress mínimo para los animales que permanecieron en todo momento con sus propietarios. Las zonas de donde provinieron los animales estudiados se muestran en la figura 2.2.

Extracción de ADN y amplificación por PCR

Se realizó el aislamiento de ADN a partir de las muestras sanguíneas obtenidas. La técnica empleada fue la de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (anexo 1).

Se amplificaron por PCR las secuencias correspondientes a los exones 6 y 7 del gen *CYP2D15*. En la tabla 2.2 se muestran los cebadores empleados en cada caso.

Los productos amplificados fueron secuenciados (secuencia automática: Capillary electrophoresis, 3730 XL) en el servicio MacroGen, Corea. Se realizó el alineamiento de las muestras analizadas con el programa BioEdit (<http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit/bioedit.html>), y se compararon con la secuencia publicada en el GenBank correspondiente a la raza canina Beagle (número de acceso GenBank: AB004268.1) con el programa Blast (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

	Cebador empleado
Exón 6	<i>Forward:</i> CAGGAAAGAGGATCGAGGCG
	<i>Reverse:</i> ATTGTCCCGGACTCCTCACT
Exón 7	<i>Forward:</i> TCTCTCCCTCTGCCCCAGAG
	<i>Reverse:</i> CCCAGGCTGTCCATCCTCTC

Tabla 2.2. Cebadores empleados en la amplificación de los exones 6 y 7 del gen *CYP2D15*.



Figura 2.2. Se muestran los Departamentos de donde se extrajeron las muestras sanguíneas.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tanto para el exón 6 como para el exón 7 se presenta una alta homología de las secuencias obtenidas con la secuencia publicada, también se ve una gran homología entre las muestras estudiadas. De todas formas, por más que todos los animales pertenecen a la misma raza, se ven variaciones entre ellos, particularmente SNPs e indels (figuras 2.3 y 2.4).

En lo que respecta al exón 6, para el que se estudiaron diez animales, ocho de ellos presentaron una gran homología. En el caso de los animales R5 y R6 existen diferencias en su secuencia nucleotídica con respecto los demás animales, incluso se pueden ver inserciones y deleciones en diferentes sitios (figura 2.3). Esto probablemente pueda ser debido a que la extracción de ADN de estos animales se realizó a partir de sangre pero empleando la técnica de Chelex 100, contrariamente a los demás donde se realizó la extracción con fenol-cloroformo-álcohol isoamílico (figura 2.3), por lo que el problema de estas muestras podría ser la calidad del ADN obtenido.

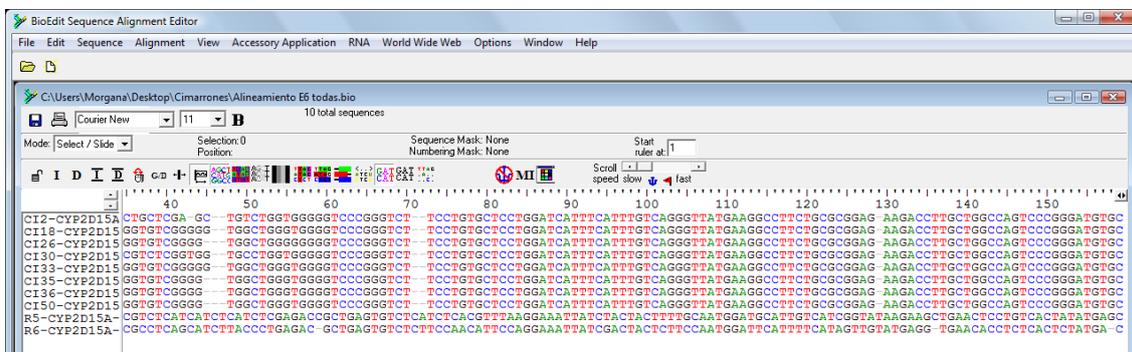


Figura 2.3. Alineamiento del exón 6 del gen *CYP2D15* incluyendo a las 10 muestras estudiadas.

La homología mencionada previamente es muy marcada cuando se realiza el alineamiento con las ocho muestras restantes (figuras 2.4). Considerando las muestras extraídas con fenol, de todas formas existen algunas diferencias entre ellas, particularmente SNPs. En el sitio 240 hay dos muestras (CI2 y CI30) que presentan cuatro nucleótidos que no se presentan en las demás. Si se ven los cromatogramas, estos animales dieron una buena calidad en su secuencia, por lo que las diferencias no se deberían, en este caso, a problemas en la misma. En la figura 2.5 se muestra el

cromatograma de CI2 y en la figura 2.6 se presenta una muestra (CI18) que no presenta esta secuencia. En ambos casos se ve que los picos del cromatograma son nítidos. Por otra parte, entre las bases 260 y 280 también se ven polimorfismos entre las secuencias, en este caso polimorfismos de nucleótido simple (SNPs). Es interesante notar que las muestras que tienen una G en el sitio 245, también la presentan en 248, 263 y 271. A esta altura de la secuenciación, los cromatogramas siguen siendo nítidos, por lo que es de considerar estos resultados, que llevan a que sea importante ampliar el estudio de este exón en mayor número de animales de esta raza y también de otras no relacionadas a la misma, con el fin de realizar comparaciones. También interesaría tener datos clínicos de animales con las diferentes variantes en la secuencia para poder realizar asociaciones con la respuesta a tratamientos farmacológicos. Las variantes que se ven luego de 280 no se toman en cuenta porque ya se está al final de la secuencia, pudiendo haber acumulación de errores en la secuenciación y no tanto eventos de mutación.

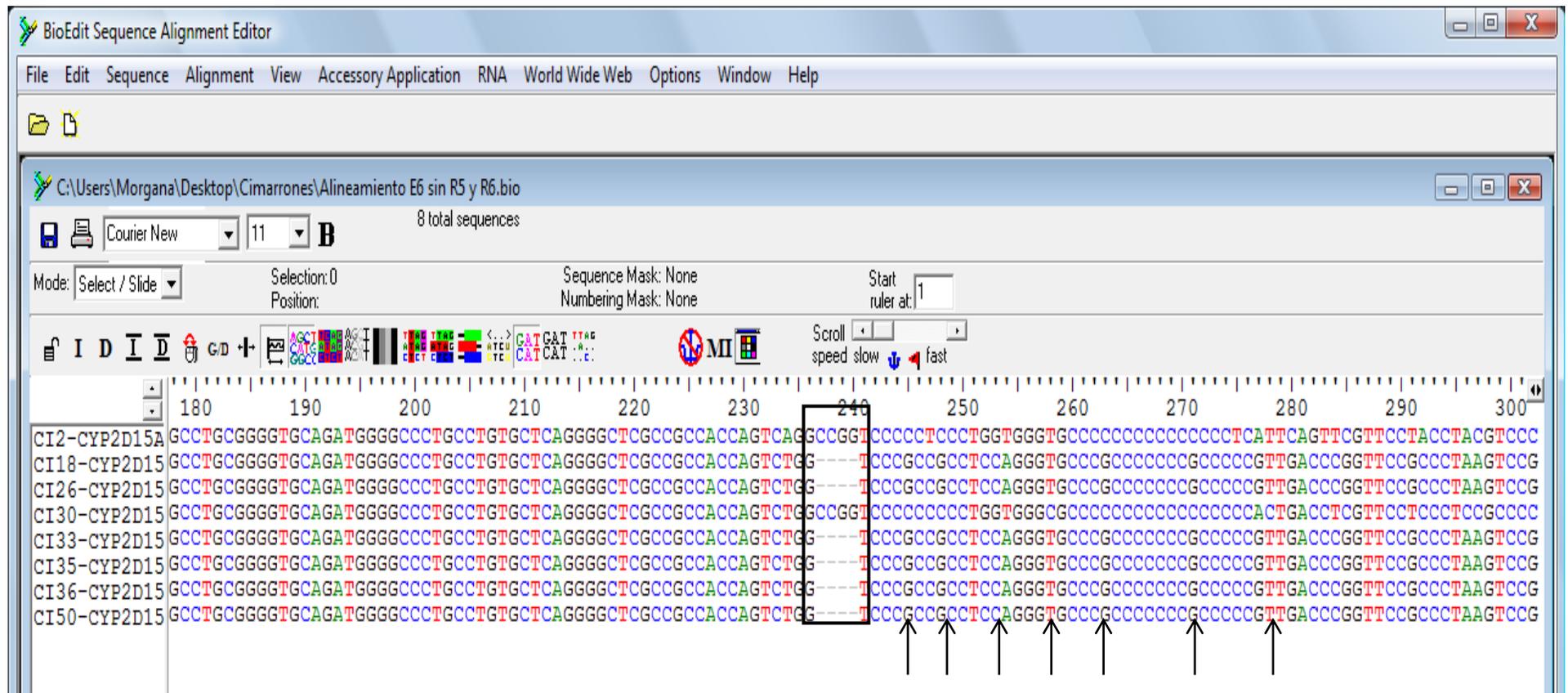


Figura 2.4. Entre los sitios 237 y 240, el rectángulo marca un indel en CI2 y CI30, como se menciona en el texto. Las flechas marcan diferentes mutaciones puntuales.

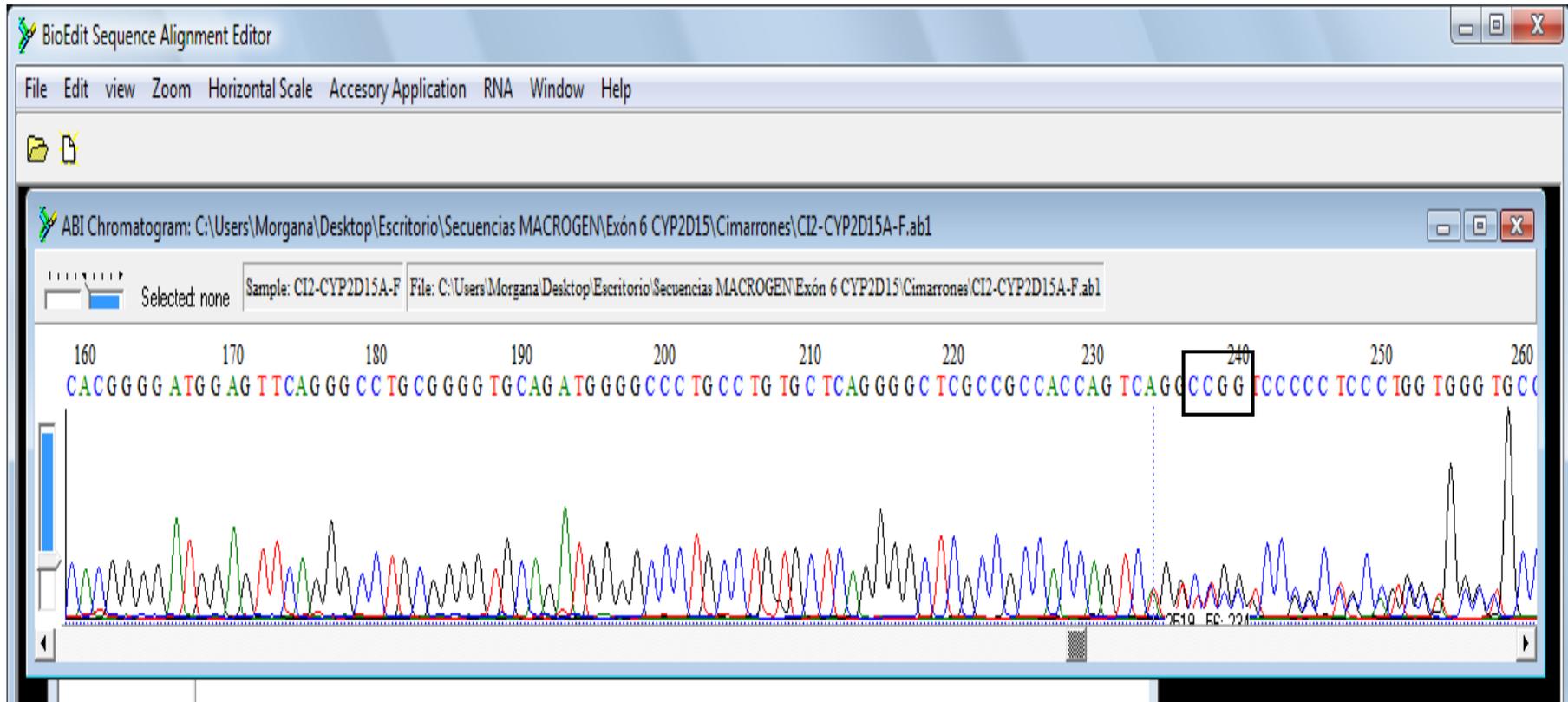


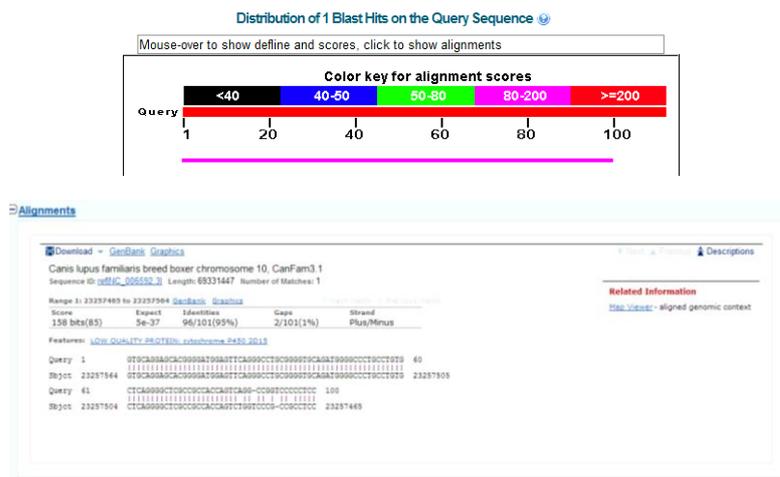
Figura 2.5. Cromatograma de la muestra CI2 donde se ven las cuatro bases adicionales, que no se ven en la mayoría de las muestras. Se marcan en el recuadro.



Figura 2.6. Cromatograma de la muestra CI18 donde se ven las cuatro bases adicionales, que no se ven en la mayoría de las muestras. Con la flecha se está marcando la zona.

En la siguiente figura (figura 2.7) se muestra el resultado obtenido al realizar una búsqueda con el programa Blast en ambos tipos de secuencias. En el primer caso (a) es con la muestra CI2, considerando los cuatro nucleótidos. En el segundo caso (b), se hace con la muestra CI18, sin considerar a esas cuatro bases insertadas. Según la búsqueda en el programa, la secuencia que presenta mayor similitud con la publicada, es sin los cuatro nucleótidos discutidos.

(a)



(b)

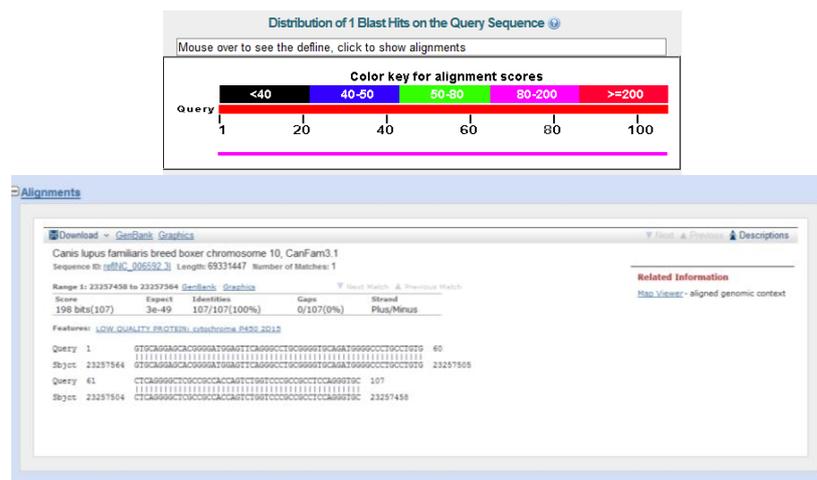


Figura 2.7. Búsqueda de una región de la secuencia del exón 6 del gen *CYP2D15* en el programa Blast (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). (a) secuencia que incluye 4 nucleótidos discutidos (muestra CI2) (b) secuencia sin los cuatro nucleótidos (muestra CI18).

En lo que respecta al exón 7 del gen *CYP2D15*, se trabajó con 25 muestras de perros cimarrones. En este caso, también se dio que la homología presente entre las diferentes muestras fuera muy alta, al igual de lo que sucedió cuando se comparó la secuencia obtenida con la publicada con el programa Blast (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

Una vez obtenidas las secuencias con una mejor calidad, se realizó el alineamiento con el programa Bioedit, entre las 25 muestras estudiadas. En la figura 2.8 se presenta el cromatograma de la misma muestra CI2 una vez que se repitió su secuenciación. Por más que se ven algunas regiones de mala calidad, no es toda la muestra por lo que igual pudo emplearse para realizar la comparación entre todas ellas.



Figura 2.8. Cromatograma de la segunda secuenciación del exón 7 en la muestra CI2.

Como se ve en las figuras 2.9 y 2.10, en estas 25 muestras analizadas ya se pueden ver varios polimorfismos. En el sitio 50, la muestra 3 presenta una delección de un nucleótido. Entre las posiciones 80 y 90 son varias las muestras que presentan diferencias entre sí. Finalmente, como se ve en la figura 2.10, la muestra CI24 presenta dos delecciones en las posiciones 208 y 213. Estas delecciones producirían cambios en el marco de lectura del gen, resultando en cambios en el producto proteico. Es recomendable confirmar la presencia de estas mutaciones y luego evaluar su posible efecto. En la figura 2.11 se muestra el cromatograma de la muestra CI24, en este caso, los picos del mismo son muy nítidos, de todas formas, estas delecciones se presentan al final de la secuencia, siendo aconsejable repetir la secuenciación para confirmar estos cambios.

En la figura 2.12 (a) y (b) se muestran dos alineamientos realizados con el programa Blast (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) de dos de las secuencias obtenidas. En ambos casos presentan una elevada homología con el gen *CYP2D15*.



Figura 2.9. Se presenta el alineamiento entre las 26 muestras de perros cimarrones. Las flechas marcan las columnas donde se presentan diferencias de nucleótidos puntuales.

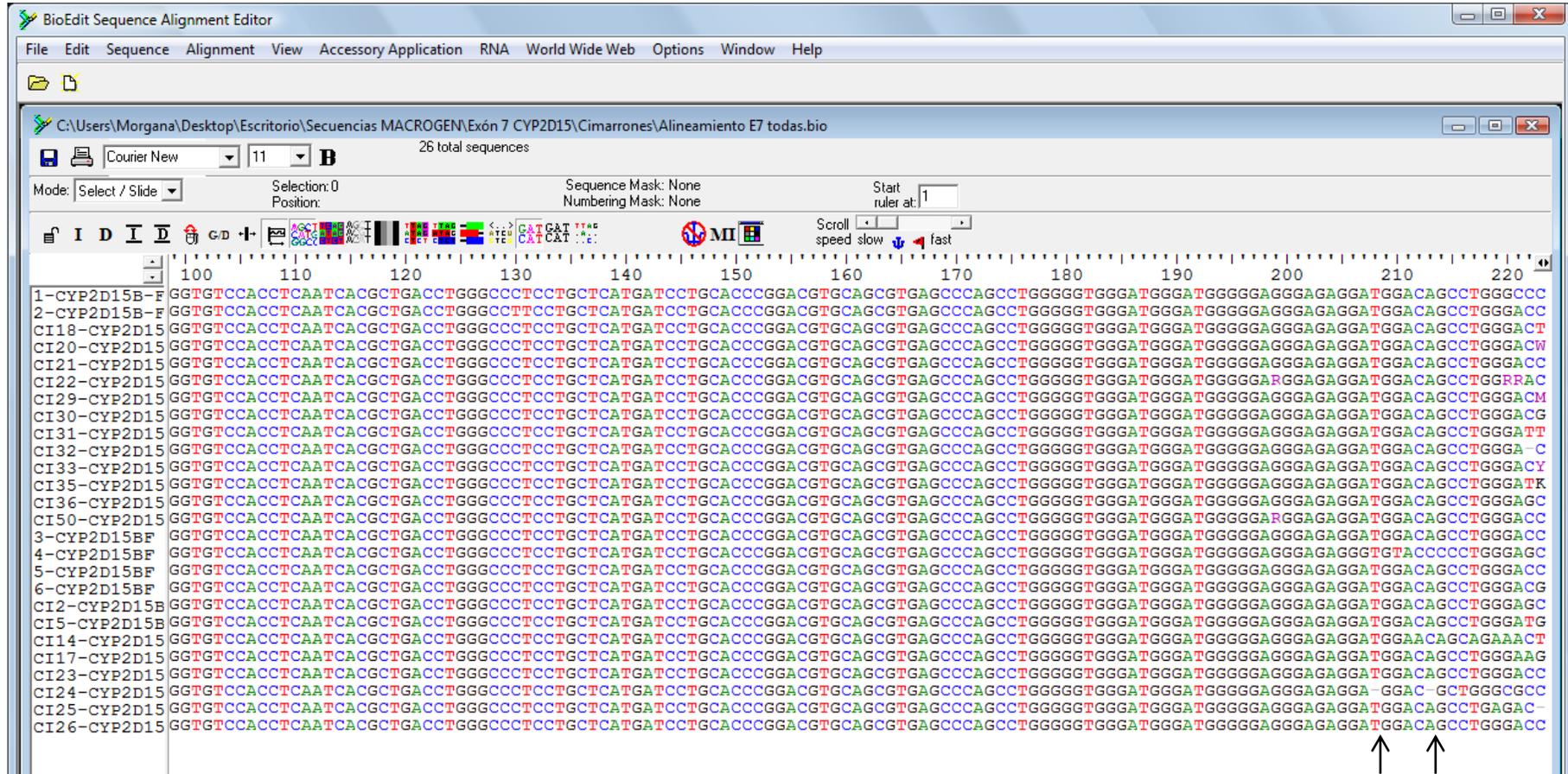


Figura 2.10. Se presenta el alineamiento de otra zona entre las 25 muestras de perros cimarrones. Las flechas marcan las columnas donde se presentan diferencias de nucleótidos puntuales.

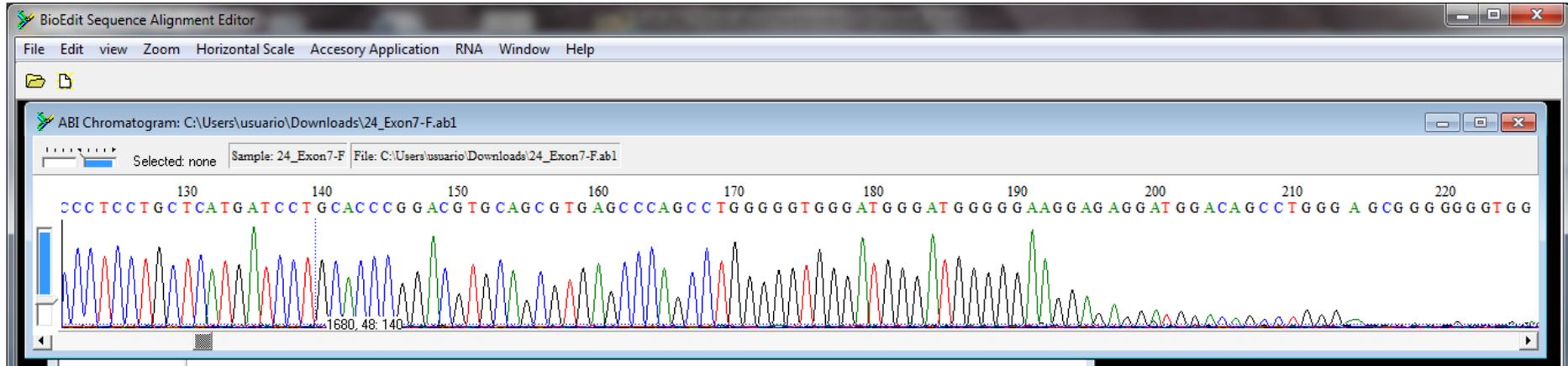
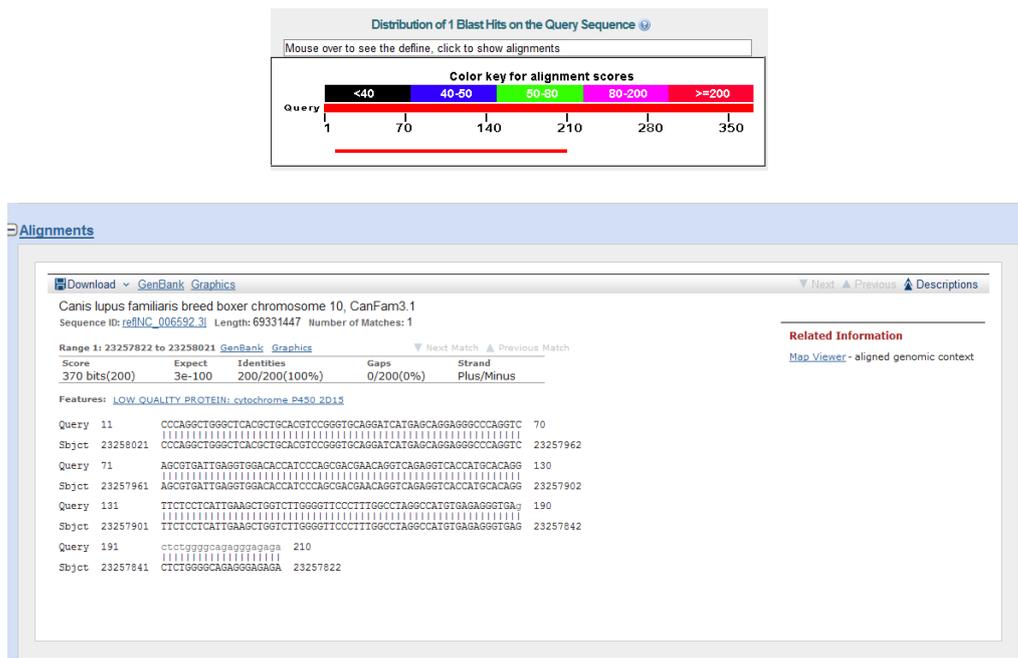


Figura 2.11. Cromatograma de la muestra CI24. Las dos deleciones mencionadas se encuentran muy al final de la secuencia.

(a)



(b)

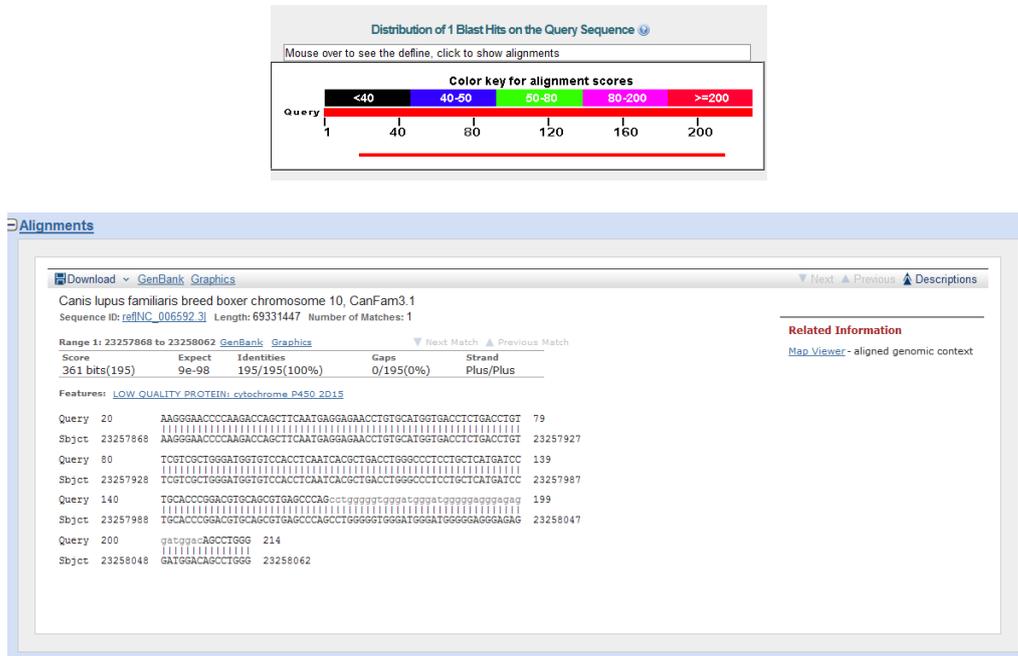


Figura 2.12. Alineamiento realizado con el programa Blast (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Se ve la homología de la secuencia estudiada con la publicada.

En este trabajo se presenta una gran homología entre las muestras estudiadas. Esto tiene sentido si se considera que estamos hablando de un gen estructural, muy conservado incluso entre diferentes especies (Martignoni *et al.*, 2006).

En ambos exones estudiados se encontraron diferentes polimorfismos, tanto cambios de una base por otra como deleciones:

- Exón 6:
 1. CI2 y CI30 presentaron una inserción de cuatro bases entre las posiciones 237-240.
 2. Diferentes SNPs entre las posiciones 240 a 280. Los cambios que se ven después no se toman en cuenta porque ya baja la calidad de la secuenciación.
 3. En el sitio 245, 248, 263 y 271, cuando se da en una G en una de estas posiciones, se da en las cuatro.

- Exón 7:
 1. En la posición 50 se presenta una deleción de un nucleótido en la muestra 3.
 2. Entre las bases 85 y 92 se ven diferentes polimorfismos.
 3. A la altura de la base 92 existe una deleción en la muestra 1.
 4. En la muestra CI24 se presentan dos deleciones en los sitios 208 y 213. Como es cerca del final de la secuencia, estos cambios hay que tomarlos con precaución.

En este trabajo se estudian los dos exones por separado sin considerar lo que sucede con el resto del gen. En particular las deleciones encontradas estarían causando un cambio en el marco de lectura, por lo que habría que ver qué cambios producirían en la proteína. Sería importante confirmar animales que presenten este polimorfismo y buscar datos clínicos que indiquen alguna diferencia en su respuesta a tratamientos médicos. En los casos donde se produce un cambio de nucleótido, habría que considerar en qué posición se encuentra y si se está produciendo un cambio en el aminoácido o no, y luego ver la proteína final (Rodríguez, 2011).

En trabajos previos donde se caracterizó al gen *CYP2D15*, se estudiaron muy pocos animales por raza (Rodríguez, 2011). En este trabajo, se estudiaron 10 animales para el exón 6 y 25 para el exón 7. Esto hace que, para el perro cimarrón, ya puedan tenerse en cuenta algunas consideraciones. De todas formas interesa ampliar el

número de animales estudiado, correlacionar las variaciones encontradas con diferentes respuestas a tratamientos farmacológicos, realizar comparaciones con otras razas caninas.

ANEXO 1. EXTRACCIÓN DE ADN CON FENOL-CLOROFORMO-ALCOHOL ISOAMÍLICO

Se mezclan 5 ml de sangre (extraída con EDTA como anticoagulante) con 5 ml de solución de extracción I. Se agita por inversión durante 10 minutos. Se centrifuga a 800 g durante 10 minutos.

Solución I

10 mM Tris-Cl, pH 7.6

10 mM KCl

10 mM MgCl₂

Se deja 1 ml de sobrenadante y se agrega 120 µl de detergente Nonidet P40 (lisis celular). Se mezcla con micropipeta y el contenido se pasa a tubos Eppendorf (1.5 ml). Se mezcla durante 10 minutos y se agita con vortex hasta disgregar el pellet celular.

Se centrifuga a 800 g durante 5 minutos para concentrar los núcleos descartando el sobrenadante (en esta etapa el material puede conservarse a -20°C para posteriormente continuar con la técnica de extracción).

Se resuspende el pellet 2 minutos en 800 µl de solución de extracción II para lisar los núcleos celulares.

Solución II

10 mM Tris-Cl pH 7.6

10 mM KCl

10 mM MgCl₂

0.5 M NaCl

0.5% SDS

2 mM Na₂EDTA

Se agrega 400 µl de una mezcla de fenol (equilibrado y saturado con 1 M Tris-Cl pH 8), cloroformo, alcohol isoamílico en proporciones 25:24:1.

Se mezcla por inversión durante 15 minutos.

Se centrifuga a 800 g durante 5 minutos.

Se transfiere con micropipeta la fase superior evitando aspirar material proteico de la interfase y se coloca el sobrenadante en un tubo Eppendorf.

Se precipita el ADN del sobrenadante con dos volúmenes de etanol 95% frío.

Se microcentrifuga a 14000 g.

Se lava el pellet con etanol 70%.

Se deja que el ADN se deshidrate y se evapore el alcohol dejándolo a temperatura ambiente durante 24 horas.

Se resuspende el ADN en 150 μ l de TE (10 mM Tris-Cl pH 8, 1 mM Na₂EDTA).

Se deja un día a temperatura ambiente para una completa resuspensión.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS (CAPÍTULO 2)

- Assunção, F. (1997) “El Perro Cimarrón.” Apartado de la Revista del Instituto Histórico y Geográfico del Uruguay. 37: 23 –72
- Gagliardi R, Llambí S, Arruga MV. (2011) Estudio molecular del gen CYP2D15 (citocromo P450) en el perro Cimarrón Uruguayo AICA 1: 313-315
- Martignoni M, Groothuis G, de Kanter R. (2006) Species differences between mouse, rat, dog, monkey and human CYP-mediated drug metabolism, inhibition and induction. *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology* 2: 875-894
- Martín-Jiménez T. (2002) Metabolismo, excreción y modelos farmacocinéticos. Pp 44-54 En Botana L, Landoni F, Martín-Jiménez T. *Farmacología y Terapéutica Veterinaria*, pp 734. Editorial: Mc Graw-Hill/Interamericana de España. ISBN-84-486-0471-7
- Nishimuta H, Nakagawa T, Nomura N, Yabuki M. (2013) Species differences in hepatic and intestinal metabolic activities for 43 human cytochrome P450 substrates between humans and rats or dogs. *Xenobiotica*, Early Online: 1-8
- Orellana M, Guajardo V (2004) Actividad del citocromo P450 y su alteración en diversas patologías. *Rev Méd Chile* 132: 85-94
- Rodríguez M. Caracterização do gene cyp2d15 em canídeos domésticos e selvagens. (2010) Tese de Doutor em Ciências. Universidad de Paraná, Curitiba, Brasil.
- Silva Valdés, J. (1957) Los Perros Cimarrones. Almanaque del Banco de Seguros del Estado. Montevideo, 334p Silveira C, Fernández G, Barba C. (1998) El Perro Cimarrón, la Raza Canina Autóctona del Uruguay. *Archivos de Zootecnia* 47: 533–536
- Silveira C, Fernández G, Barba C. (2002) Primeros Datos de la Caracterización Etnológica del Perro Cimarrón. *Archivos de Zootecnia* 51: 223–228
- Trepanier L. (2006) Cytochrome P450 and its Role in Veterinary Drug Interactions. *Vet. Clin. Small Anim.* 36: 975-985
- <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>
- <http://buscon.rae.es/>

- <http://www.kcu.com.uy>
- <http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit/bioedit.html>
- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/mapview/>
- <http://www.wordreference.com/definicion/cimarr%F3n>

CAPÍTULO 3. ANÁLISIS DE 26 SNPs PERTENECIENTES A LOS GENES *MDR1*, *CYP1A2* Y *CYP2B11* EN CUATRO RAZAS CANINAS EN URUGUAY

INTRODUCCIÓN

Cuando se administra una misma droga a un grupo de pacientes podemos tener diferentes reacciones:

- a. Que no sea beneficiosa pero tampoco cause ningún daño.
- b. Que no sea beneficiosa pero cause intoxicación (reacciones adversas).
- c. Que produzca el efecto buscado y también, reacciones adversas.
- d. Que produzca el efecto buscado sin producir reacciones adversas.

Estos puntos se dan por la interacción de los fármacos administrados con diversas enzimas que son las responsables de su distribución en el organismo, transporte, metabolismo, eliminación, etc. Estas enzimas son codificadas por genes en los que, en muchos de ellos, se han descrito polimorfismos. Muchos de éstos son causantes de cambios en la proteína en sí misma produciéndose, en algunos casos, alteraciones en su función. El ejemplo clásico en caninos, es la mutación *mdr1-1Δ* descrita por Mealey en la raza Collie (Mealey *et al.*, 2001). También se han descrito gran número de mutaciones puntuales (SNPs) en numerosos genes, muchos de ellos relacionados al metabolismo de fármacos, en la superfamilia del citocromo P450 (Nishimuta *et al.*, 2013; Zhang, 2010; Wenker, 2009; Fleischer *et al.*, 2007; Mise *et al.*, 2004).

Estos factores han hecho que, desde que se están estudiando los genomas de diferentes especies, se haya producido un impulso en el análisis de estos genes asociados con la respuesta a las terapias farmacológicas. Esto es lo que ha dado en llamarse *farmacogenética* (Mealey, 2006). En humanos se están realizando estudios con el fin de lograr lo que es la terapia individualizada, que busca alcanzar dos objetivos fundamentales:

- a. Predecir qué pacientes son susceptibles de desarrollar intoxicación por una droga en particular.
- b. Predecir qué pacientes son los que probablemente se beneficien más con un tratamiento farmacológico determinado.

Cualquiera de estos dos puntos se podría lograr teniendo en cuenta las variantes presentes en los diferentes pacientes en los genes que codifican para las proteínas mencionadas previamente. En Medicina Veterinaria, por más que se dista mucho de alcanzar estos objetivos, también es deseable conocer los cambios presentes en estos

genes. Esto permitiría llegar a lograr los mismos objetivos que se plantean en humanos. El clínico podría seleccionar el tratamiento que considerase más adecuado para un animal en particular, sin caer en el ensayo y error habitual (Mealey 2006). Esto lograría ventajas respecto del paciente en lo que se refiere a un menor período de tiempo en la instauración del tratamiento y, en lo que respecta al propietario, un descenso en el costo de los mismos.

Transporte de fármacos: La superfamilia ATP binding cassette (ABC)

Esta superfamilia ABC es la principal en lo que se refiere al transporte de fármacos. Son proteínas transmembrana, se unen al ATP empleando su energía con el fin de movilizar sustratos a través de las membranas celulares. Los genes que codifican para estas proteínas se encuentran sumamente conservados entre diferentes especies y, en el genoma eucariota, se encuentran muy dispersos. La mayoría de estos genes ha existido desde el comienzo de la evolución eucariota. Estos genes se agrupan en subfamilias dentro de la superfamilia ABC. En mamíferos se han descrito siete subfamilias de genes ABC y, en humanos, se han asociado algunos de estos genes con enfermedades: Fibrosis quística, adrenoleucodistrofia, desórdenes en el transporte de las sales biliares, degeneración de la retina, etc (Dean *et al.*, 2001).

RESISTENCIA MÚLTIPLE A DROGAS

Las células expuestas a sustancias tóxicas pueden desarrollar por diferentes elementos:

- Captación disminuida.
- Detoxificación aumentada.
- Cambio en las proteínas blanco.
- Excreción aumentada.

Varios de estos puntos pueden llevar a lo que es la resistencia múltiple a drogas (MDR), donde una célula es resistente a una serie de drogas (Wu *et al.*, 2014). Esto ha sido un problema en el tratamiento de tumores con drogas antitumorales (Tomiyasu *et al.*, 2014; Tomiyasu *et al.*, 2013). Este es uno de los mayores problemas por los que, en Medicina Humana, interesa estudiar estos genes. También se ha visto que estas células MDR muchas veces presentan inestabilidad genómica y pérdida de los puntos de control, lo que hace aún más difícil el tratamiento antitumoral. Por lo menos seis

genes, en humanos, se han asociado con el transporte de drogas: *ABCB1 (MDR1)*, *ABCC1*, *ABCC2*, *ABCC3*, *ABCC4*, *ABCC5* y *ABCG2*. Ver tabla 1.1 (Dean *et al.*, 2001).

LA SUPERFAMILIA FAMILIA ABC EN CANINOS. EL GEN *MDR1*

El inicio de los estudios en caninos de esta superfamilia se relaciona indefectiblemente con el uso de la familia de fármacos conocida como lactonas macrocíclicas, dentro de la que se ubica el antiparasitario ivermectina. La intoxicación de caninos de raza Collie, llevó a que se describiera por Katrina Mealey, la mutación *mdr1-1Δ* responsable de la misma, al producir una deleción de 4pb. Otros autores (Mizukami *et al.*, 2013) describieron mutaciones puntuales responsables de diferentes cambios en el funcionamiento de la glucoproteína P producto del mismo. En particular Mizukami estudia la mutación c.-6-180T>G por estar asociada a la epilepsia idiopática resistente al fenobarbital, en Border Collie (Mizukami *et al.*, 2013).

En el capítulo 1 se presenta una mayor descripción del gen MDR1 en caninos.

Metabolismo de fármacos: La superfamilia del citocromo P450

Esta superfamilia formada por un grupo de hemoproteínas, involucrada en numerosas reacciones oxidativas (fase I), presenta un rol decisivo en la cinética y en el metabolismo de xenobióticos (fármacos). Usualmente, los animales se emplean como modelo para predecir la cinética y toxicidad que pueda darse en humanos. Esta comparación entre diferentes especies presenta dos dificultades:

- En humanos, existen grandes diferencias entre individuos en lo que se refiere a cada enzima del citocromo P450. Esto es debido a diferencias fenotípicas causadas por polimorfismos genéticos.
- Un gran nivel de identidad en la secuencia aminoacídica de diferentes enzimas no significa que tengan similitud en las especificidades catalíticas. Tanto como el cambio en un aminoácido, puede llevar a que la especificidad de sustrato cambie. Esto lleva a que los ortólogos no permitan una comparación de las especificidades catalíticas entre especies.

(Martignoni *et al.*, 2006; Bogaards *et al.*, 2000).

Pese a la necesidad de contar con información de las diferentes especies, los datos existentes no son completos.

La superfamilia CYP se divide en familias, representadas por un número, cuando existe una identidad en la estructura primaria de más del 40%, cada familia se divide en subfamilias, identificadas con una letra, cuando la identidad es mayor al 55%, un segundo número identifica a la enzima individual. Las enzimas de esta superfamilia que se han descrito como las más importantes en humanos son CYP1A2, 2A6, 2B6, 2C, 2D6, 2E1 y 3A4. En la figura 3.1 se muestran las principales subfamilias de diferentes especies (Martignoni *et al.*, 2006; Bogaards *et al.*, 2000). Existen otras familias, más allá de CYP3, que generalmente se relacionan a procesos endógenos, particularmente síntesis hormonal. Las enzimas CYP se pueden encontrar básicamente en todos los órganos, particularmente en hígado, intestino delgado, epitelio nasal, piel, bazo y riñón; también en testículo, cerebro y otros órganos. De estos tejidos, hígado e intestino delgado son los mayormente involucrados en la eliminación de fármacos mediada por CYP (Martignoni *et al.*, 2006).

Family	Subfamily	Human	Mouse	Rat	Dog	Monkey
CYP1	A	1A1, 1A2	1A1, 1A2	1A1, 1A2	1A1, 1A2	1A1, 1A2
	B	1B1	1B1	1B1	1B1	1B1
CYP2	A	2A6, 2A7, 2A13	2A4, 2A5, 2A12, 2A22	2A1, 2A2, 2A3	2A13, 2A25	2A23, 2A24
	B	2B6, 2B7	2B9, 2B10	2B1, 2B2, 2B3	2B11	2B17
	C	2C8, 2C9, 2C18, 2C19	2C29, 2C37, 2C38, 2C39, 2C40, 2C44, 2C50, 2C54, 2C55	2C6, 2C7*, 2C11*, 2C12*, 2C13*, 2C22, 2C23	2C21, 2C41	2C20, 2C43
	D	2D6, 2D7, 2D8	2D9, 2D10, 2D11, 2D12, 2D13, 2D22, 2D26, 2D34, 2D40	2D1, 2D2, 2D3, 2D4, 2D5, 2D18	2D15	2D17 [†] , 2D19 [†] , 2D29 [†] , 2D30 [†]
	E	2E1	2E1	2E1	2E1	2E1
CYP3	A	3A4, 3A5, 3A7, 3A43	3A11, 3A13, 3A16, 3A25, 3A41, 3A44	3A1/3A23, 3A2*, 3A9*, 3A18*, 3A62	3A12, 3A26	3A8

*Gender difference.
[†]Strain specific.

Figura 3.1. Principales subfamilias del citocromo P450 en diferentes especies (tomado de Martignoni *et al.*, 2006).

La particularidad que tiene esta superfamilia es que algunas de sus enzimas pueden ser inducidas o inhibidas. Además de esto, los polimorfismos genéticos pueden dar como resultado diferencias en la actividad metabólica entre individuos. Se ha descrito que dichos polimorfismos pueden tener consecuencias clínicas como causar intoxicación ó, en otros casos, pueden ser responsables de alterar la eficacia de determinadas drogas en los individuos afectados (Martignoni *et al.*, 2006). Existen gran cantidad de fármacos que son sustrato de proteínas de la superfamilia CYP450. En la tabla 3.1 se muestran algunas de las drogas sustrato de proteínas CYP en caninos y en su ortólogo humano (Trepanier, 2006).

CYP450 humanos	Sustratos en humanos	CYP caninos	Sustratos en caninos
CYP1A1	Químicos ambientales	CYP1A	Toxinas ambientales
CYP1A2	Cafeína, teofilina, ciprofloxacina	CYP1A2	Fluoroquinolonas, teofilina, omeprazol
CYP2B6	Propofol	CYP2B11	Propofol, diazepam, progesterona, testosterona, ciclofosfamida, etc
CYP2D6	Tramadol, fenotiazinas, clorfeniramina, clorpromazina, etc	CYP2D15	Celecoxib, imipramina, etc
CYP3A4	Ketoconazol, eritromicina, digoxina, diazepam, etc	CYP3A12 CYP3A26	Eritromicina, diazepam, progesterona, etc

Tabla 3.1. Sustratos principales de distintas subfamilias CYP (Trepanier, 2006).

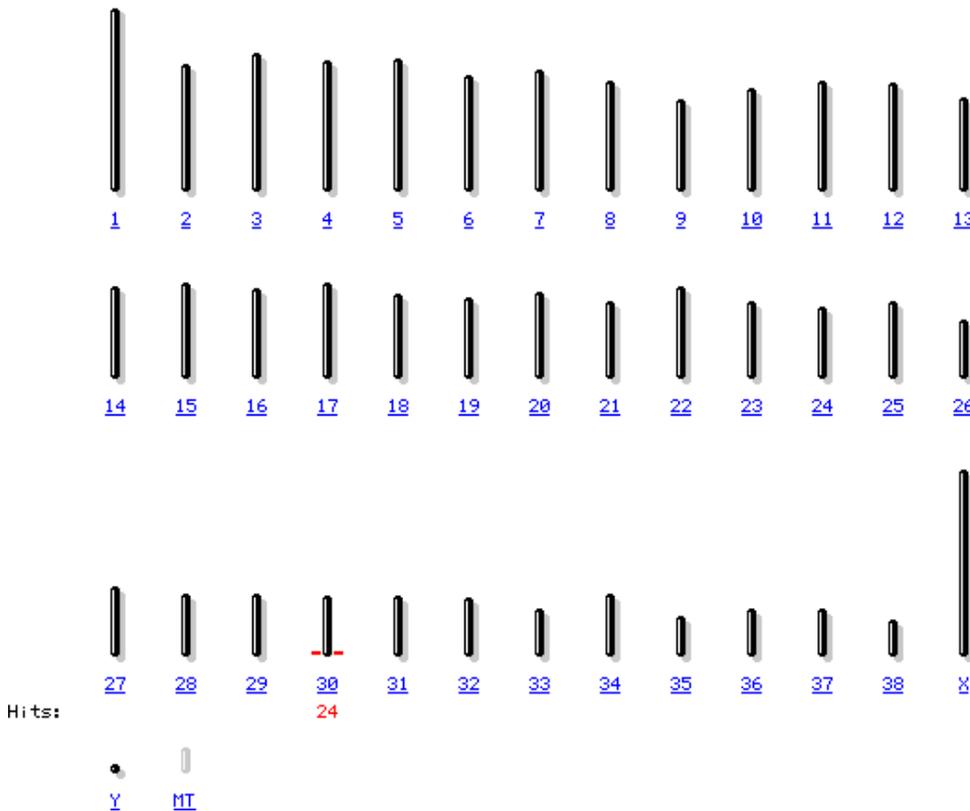
La subfamilia CYP1A: El gen *CYP1A2*

Se ha comunicado que la subfamilia CYP1A está muy conservada entre especies. Incluye dos enzimas: *CYP1A1* y *CYP1A2*. Ambas han sido muy estudiadas dado que se ha visto que tienen un papel importante en el metabolismo de dos familias grandes de carcinógenos: Hidrocarburos aromáticos; arilaminas (Martignoni *et al.*, 2006).

CYP1A2 se expresa principalmente en hígado y poco en tejidos extra hepáticos en humano, rata y ratón; mientras que en perro y mono, se expresa a niveles bajos en animales no tratados. Pese a esto, existe una gran similitud en la secuencia aminoacídica. En humanos, *CYP1A2* está involucrada en el metabolismo de aproximadamente el 4% de las drogas existentes en el mercado (Martignoni *et al.*, 2006). Contrariamente a lo que sucede en humanos, en caninos se han observado diferencias farmacocinéticas entre individuos cuando se administran drogas que se eliminan por medio de *CYP1A2* (Whiterock *et al.*, 2007; Kamimura *et al.*, 2006). Estudios previos en caninos describieron la mutación *CYP1A2* 1117 C>T que produce un codón stop prematuro (Whiterock *et al.*, 2007; Tenmizu *et al.*, 2006; Mise *et al.*, 2004; Tenmizu *et al.*, 2004).

En la figura 3.2 se presenta la ubicación en el cromosoma 30 del gen *CYP1A2* en el idiograma canino (programa MapViewer) y en la parte b un esquema indicando exones e intrones del mismo. Consta de siete exones, da una proteína con 1778 residuos aminoacídicos (Ensembl: www.ensembl.org).

(a)



(b)

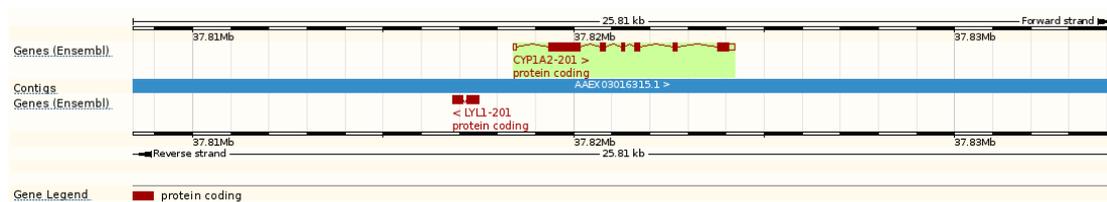


Figura 3.2. a. Se muestra la ubicación del gen *CYP1A2* en el idiograma canino (búsqueda realizada en el programa MapViewer: www.ncbi.nlm.nih.gov/mapview). b. Esquema del gen *CYP1A2* mostrando sus exones e intrones.

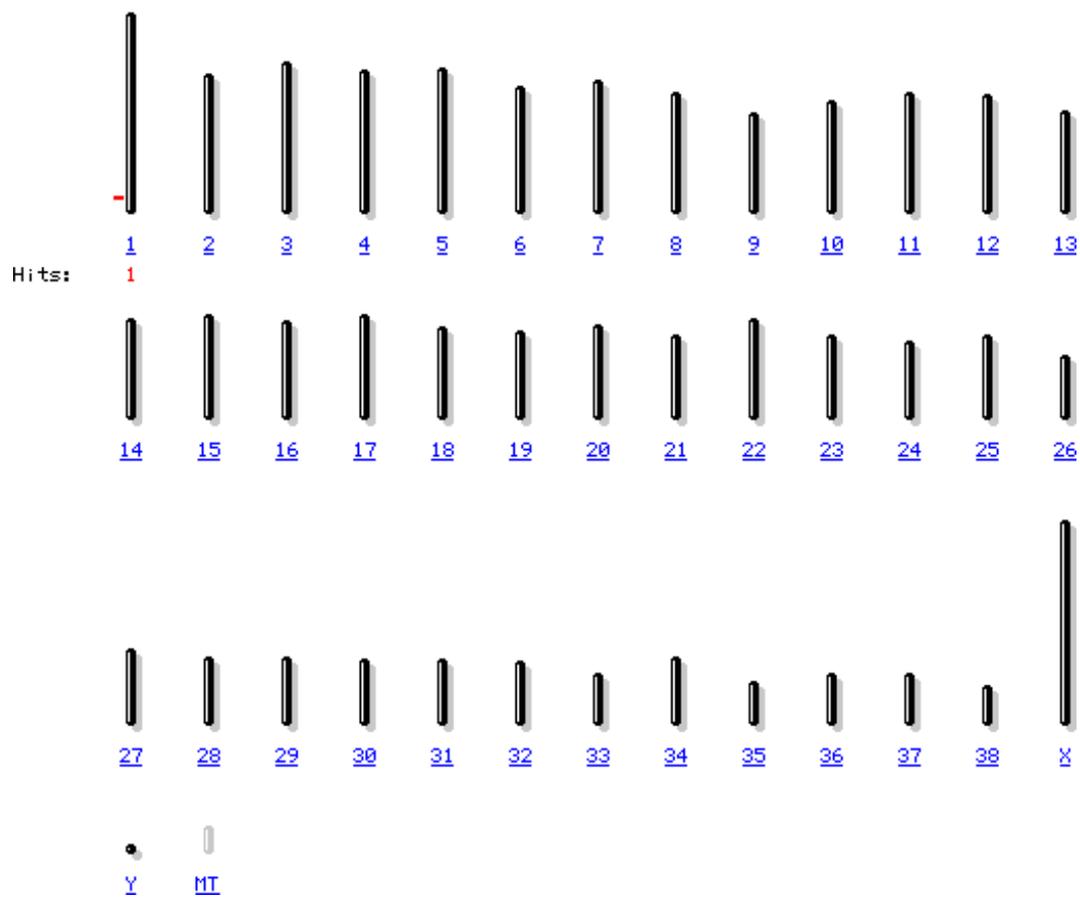
La familia CYP2B: El gen *CYP2B11*

En mamíferos se han identificado varias isoformas de la familia CYP2B. En humanos, esta familia está conformada por las proteínas CYP2B6 y -2B7. *CYP2B6*, gen ortólogo del *CYP2B11* canino, se expresa en hígado y en algunos tejidos extrahepáticos. Este gen está involucrado en el metabolismo de cerca del 25% de los fármacos que se encuentran en el mercado en la actualidad como algunos antitumorales y anestésicos. También es responsable de algunos pro-carcinógenos como ser un contaminante ambiental, la aflatoxina B1. *CYP2B6* presenta grandes diferencias entre individuos en lo que se refiere a su expresión. Esto sugiere grandes diferencias entre individuos en la respuesta a drogas metabolizadas por esta proteína (Martignoni et al., 2006).

La enzima *CYP2B11* canina está involucrada en el metabolismo de una gran cantidad de sustancias entre las que se encuentran androstenediona y progesterona a nivel endógeno, y propofol (anestésico) y ciclofosfamida (quimioterápico) a nivel exógeno. Como otros CYP, es inducido e inhibido por determinados fármacos. En el primer caso es por fenobarbital y en el segundo por cloranfenicol, ketoconazol, diazepam y otras drogas de uso en clínica veterinaria (Baratta et al., 2009). En particular, el propofol, metabolizado por esta enzima, causa diferentes respuestas entre individuos. Estudios previos han propuesto variaciones en el gen *CYP2B11* como responsables de estas diferencias (Wenker, 2009).

El gen *CYP2B11* se expresa en el hígado canino, representando alrededor del 10% de los CYP hepáticos (Baratta et al., 2009). En esta especie se encuentra en el cromosoma 1, consta de nueve exones y su producto es de 2951 residuos aminoacídicos (ver figura 3.3).

(a)



(b)

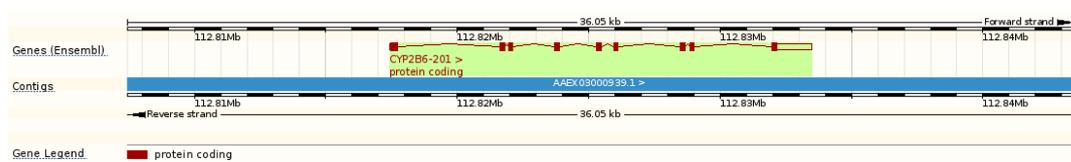
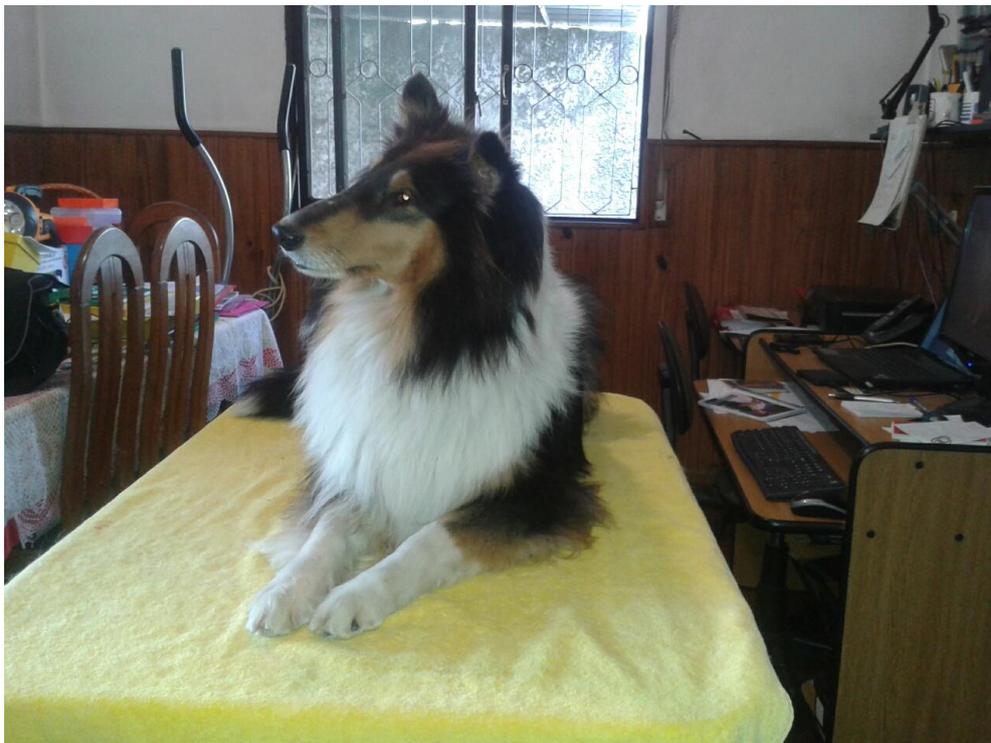


Figura 3.3. a. Se muestra la ubicación del gen *CYP2B11* en el idiograma canino (búsqueda realizada en el programa MapViewer: www.ncbi.nlm.nih.gov/mapview). b. Esquema del gen *CYP2B11* mostrando sus exones e intrones.

Razas caninas

Collie



www.mundoperros.es

Estos perros presentan un carácter tranquilo y, en general, no presentan conductas indeseables. Tienen facilidad para el aprendizaje y para el entrenamiento de obediencia. No suelen ser agresivos con otros perros. Originalmente eran animales de trabajo, en particular como perro pastor de ovejas. En la actualidad son buenos animales de compañía aunque mantienen su instinto inicial. Como guardianes no son los mejores, aunque son aceptables. Esta raza presenta dos variedades, los perros de pelo largo y los de pelo corto, siendo ésta la única diferencia existente entre ellas. Se cree que estos animales, en un inicio se fueron desarrollando a partir de perros traídos a Escocia por los romanos, estos animales se cruzaron con animales locales. Luego

se fueron seleccionando animales durante cientos de años. Originalmente trabajaban con ganado (como se mencionó previamente), “eran capaces de llevar el ganado a pastar, defenderlo y devolverlo al corral sin la presencia del dueño.” Si en este momento se les da la oportunidad, pese a su aspecto doméstico, lo más probable es que estos perros sean capaces de volver a su trabajo inicial (www.fci.be).

Labrador Retriever



En la costa de Newfoundland se han visto pescadores con perros similares a Labradores trabajando en la recuperación de peces. Aquí se cree que se dio el origen del Labrador. Son excelentes perros de agua, con un pelaje resistente a la misma.

Son perros con buen carácter, ágiles. Tienen un excelente olfato y su labor de “cobrar” lo hace con delicadeza. Es un perro al que le atrae el agua, inteligente, adaptable, vivaz y dócil. No presenta rasgos de agresividad (www.fci.be).

Cimarrón Uruguayo



Estos perros descienden de los perros que trajeron los colonizadores españoles y portugueses, que luego se cruzaron en la región. De estos cruzamientos es que surgen los perros posteriormente. Originalmente, cumplían funciones de guardia en los establecimientos rurales y trabajo con ganado. Son perros de tipo moloso, de talla mediana, fuertes, compactos, con buena osatura, musculosos y ágiles. Presentan un carácter equilibrado y gran coraje (www.fci.be).

El estándar completo de esta raza se presenta en el capítulo 2.

Ovejero Alemán



El estándar de esta raza se presenta en el capítulo 1.

OBJETIVOS**OBJETIVO GENERAL**

Estudiar tres genes asociados a las diferencias en la respuesta farmacológica en caninos.

OBJETIVO PARTICULARES

- Estudiar 26 mutaciones puntuales (SNPs) pertenecientes a los genes *MDR1*, *CYP1A2* y *CYP2B11* en cuatro razas de caninos (Cimarrón Uruguayo, Collie, Labrador Retriever y Ovejero Alemán).
- Comparar los resultados obtenidos entre las cuatro razas estudiadas.
- Analizar cual/cuáles de los SNPs estudiados pueden estar asociados a diferencias en la respuesta en la terapia farmacológica.

HIPÓTESIS

- Los SNPs analizados se encuentran en las cuatro razas caninas estudiadas.
- Existen diferencias entre las razas Cimarrón Uruguayo, Collie, Labrador Retriever y Ovejero Alemán entre los 26 SNPs estudiados.
- Algunos de los SNPs estudiados pueden emplearse como candidatos para estudiar asociaciones con la respuesta farmacológica.

MATERIALES Y MÉTODOS

Muestra analizada

Se estudiaron 120 caninos de las razas Collie, Labrador Retriever, Cimarrón Uruguayo y Ovejero Alemán (30 animales por raza). Estos animales provinieron de las zonas sur-sureste del país (figura 3.4). De cada animal se obtuvo una muestra sanguínea (entre 2-3cc) de la vena antebraquial o de la safena. Se mantuvieron condiciones de asepsia, se emplearon materiales estériles. La sangre se extrajo empleando EDTA potásico como anticoagulante. Una vez obtenida la muestra, se mantuvo refrigerada o congelada. Durante todo el procedimiento el animal estuvo con su propietario.

Extracción de ADN

El aislamiento de ADN se realizó a partir de las muestras sanguíneas obtenidas. Se empleó la técnica de acetato de amonio (ver anexo 1 del capítulo 1) o de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico en el caso de los cimarrones (anexo 1 del capítulo 2).



Figura 3.4. Se marcan los Departamentos de donde se extrajeron las muestras de cada raza.

SNPs estudiados

Se estudiaron 26 polimorfismos de nucleótido simple (SNP) pertenecientes a tres genes: *MDR1*, *CYP1A2* y *CYP2B11*. De estos 26 SNPs, cinco corresponden al gen *MDR1*, 20 al *CYP1A2* y uno al *CYP2B11*. Para realizar el genotipado, se enviaron las muestras de ADN obtenidas al servicio GeneSeek, Lincoln, Nebraska, EEUU, donde se realizó el mismo. En la tabla 3.2 se presentan las muestras enviadas.

Análisis estadístico

Una vez obtenido el genotipo para cada uno de los 26 SNPs analizados, se realizó la comparación entre las diferentes razas estudiadas. Los programas empleados para evaluar los SNPs fueron *GENETIX*, *ARLEQUIN* y *SNPStat*.

LABRADORES	COLLIES	OVEJERO ALEMÁN	CIMARRÓN
L1	C7	OA1	CI1
L2	C8	OA2	CI2
L3	C9	OA3	CI4
L4	C10	OA4	CI7
L5	C11	OA5	CI8
L6	C12	OA6	CI14
L7	C13	OA7	CI16
L8	C14	OA8	CI17
L9	C15	OA9	CI18
L10	C16	OA10	CI20
L11	C17	OA11	CI22
L12	C18	OA12	CI23
L13	C19	OA13	CI25
L14	C20	OA14	CI26
L15	C21	OA15	CI27
L16	C22	OA16	CI29
L17	C23	OA17	CI30
L18	C24	OA18	CI31
L19	C25	OA19	CI32
L20	C26	OA20	CI33
L21	C27	OA21	34
L22	C28	OA22	35
L23	C29	OA23	CI36
L24	C30	OA24	CI38'
L25	C31	OA25	CI39
L26	C32	OA26	40
L27	C33	OA27	41
L28	C34	OA28	CI50
L29	C35	OA29	1
L30	C36	OA30	2

Tabla 3.2. Muestras enviadas a genotipar a GeneSeek.

El programa **Genetix** se empleó para analizar los 26 marcadores genéticos estudiados. Cada uno de los marcadores mencionados se identificó con números correlativos: Los cinco SNPs del locus *ABCB1* (*MDR1*) se identificaron como SNP1 al SNP5, los 20 SNPs correspondientes al locus *CYP1A2* se identificaron como SNP6 al SNP25 y el SNP del locus *CYP2B11* se identificó como SNP26.

Para realizar el análisis de búsqueda de marcadores relacionados con el carácter sensibilidad/resistencia a fármacos se utilizó el programa **SNPStat** (Iniesta *et al.*,

2005). Este tipo de estudio puede realizarse con diferentes programas estadísticos y aplicaciones web que se basan en analizar modelos de regresión logística, que son los que normalmente se usan en estudios de casos y controles. Es importante mencionar que los análisis de asociación se suelen emplear cuando se analiza un solo marcador y en caso de que se estudien varios marcadores a la vez, se utiliza el análisis de haplotipos. El programa SNPStats es muy útil cuando se dispone de un número moderado de SNPs, en torno a decenas (Iniesta *et al.*, 2005). Se puede calcular de forma sencilla teniendo en cuenta que un conjunto de n SNPs bialélicos generarán 2^n haplotipos potenciales. Las tasas de recombinación hacen que el número de haplotipos que se generan generalmente sea mucho menor que ese máximo teórico. Dado que el polimorfismo responsable de influir o modificar la expresión del carácter a analizar es desconocido, habitualmente se realiza el análisis de múltiples loci simultáneamente con el fin de identificarlo. Previo a realizar este estudio de asociación, se debe disponer de una población control, en este caso los perros cimarrones, en los que no se ha detectado el carácter a analizar: Reacciones adversas a los fármacos administrados. Para tomar esta población como control, se estudió el equilibrio Hardy-Weinberg para todos los SNPs. Se tomó como hipótesis inicial que cada SNP, por consiguiente cada locus, estaba en equilibrio. Para detectar marcadores genéticos relacionados con el carácter a estudiar, hay que seleccionar los casos con mayor probabilidad de ser portadores del o de los alelos implicados. Diversos autores indican que la combinación de haplotipos es la mejor opción para ésto, requiriéndose una estimación por métodos estadísticos. Se debe considerar que al estudiar SNPs de un mismo locus se puede dar “desequilibrio de ligamiento” dado que los haplotipos son un conjunto de alelos de varios loci que se heredan juntos. Ese ligamiento causará un desequilibrio por la asociación estadística entre alelos de loci cercanos. Este desequilibrio se genera por mutación y por selección, tendiendo a desaparecer en generaciones sucesivas por efecto de la recombinación. Cuando se analizan varios marcadores genéticos situados en un mismo cromosoma o en varios, al estimar la frecuencia de cada haplotipo hay que tener en cuenta la desviación de la frecuencia esperada (D) debido al desequilibrio de ligamiento (DL). La correlación que exista entre varios alelos en cada haplotipo estará en función de ese valor de D . La asociación entre los polimorfismos estudiados (marcadores genéticos) por el DL permite detectar la zona o zonas de interés (Loh *et al.*, 2013; Reich *et al.*, 2001). El objetivo del análisis del desequilibrio de ligamiento es identificar polimorfismos de un gen candidato que estén asociados al carácter analizado.

RESULTADOS

En el Anexo 1 se muestran los genotipos obtenidos en cada una de las razas estudiadas (Cimarrón Uruguayo, Collie, Labrador Retriever, Ovejero Alemán).

En el Tabla 3.5 se indican las frecuencias genotípicas para cada SNP y en los loci correspondientes. Según puede observarse, algunos de los SNPs se encuentran fijados, variando en algunos de ellos, según la raza:

- Collie: SNP19, SNP21, SNP22.
- Labrador: SNP2, SNP3, SNP4, SNP5, SNP19, SNP21, SNP22.
- Cimarrón: SNP1, SNP2, SNP3, SNP4, SNP5, SNP8, SNP10, SNP11, SNP13, SNP19.
- Ovejero: SNP1, SNP3, SNP4, SNP5, SNP17, SNP19.

En resumen, el Collie presentó tres de los SNPs fijados, el Labrador Retriever siete, el Cimarrón diez y el Ovejero, seis (Tabla 3.5).

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O	P
1	Cimarrón (n=25)				Collie (n=23)				Labrador (n=29)				Pastor Alemán (n=29)			
2	Frecuencia				Frecuencia				Frecuencia				Frecuencia			
3	SNP 1	(A/A) 1	(A/G) 0	(G/G) 0	(A/A) 0,739	(A/G) 0,217	(G/G) 0,043	(A/A) 0,931	(A/G) 0,069	(G/G) 0	(A/A) 1	(A/G) 0	(G/G) 0			
4	SNP 2	(A/A) 0	(A/T) 0	(T/T) 1	(A/A) 0	(A/T) 0,043	(T/T) 0,957	(A/A) 0	(A/T) 0	(T/T) 1	(A/A) 0,103	(A/T) 0,241	(T/T) 0,655			
5	SNP 3	(A/A) 0	(A/G) 0	(G/G) 1	(A/A) 0,043	(A/G) 0,217	(G/G) 0,739	(A/A) 0	(A/G) 0	(G/G) 1	(A/A) 0	(A/G) 0	(G/G) 1			
6	SNP 4	(A/A) 1	(A/G) 0	(G/G) 0	(A/A) 0,043	(A/G) 0,217	(G/G) 0,739	(A/A) 1	(A/G) 0	(G/G) 0	(A/A) 1	(A/G) 0	(G/G) 0			
7	SNP 5	(T/T) 1	(T/G) 0	(G/G) 0	(T/T) 0,739	(T/G) 0,267	(G/G) 0	(T/T) 1	(T/G) 0	(G/G) 0	(T/T) 1	(T/G) 0	(G/G) 0			
8	SNP 6	(A/A) 0,318	(A/G) 0,182	(G/G) 0,5	(A/A) 0,931	(A/G) 0,069	(G/G) 0	(A/A) 0,909	(A/G) 0	(G/G) 0,091	(A/A) 0,609	(A/G) 0,217	(G/G) 0,174			
9	SNP 7	(A/A) 0,85	(A/G) 0,15	(G/G) 0	(A/A) 0,333	(A/G) 0,667	(G/G) 0	(A/A) 0,625	(A/G) 0,25	(G/G) 0,125	(A/A) 0,88	(A/G) 0,12	(G/G) 0			
10	SNP 8	(T/T) 1	(C/T) 0	(C/C) 0	(T/T) 0,062	(C/T) 0,629	(C/C) 0,313	(T/T) 0,737	(C/T) 0,052	(C/C) 0,211	(T/T) 0,636	(C/T) 0,273	(C/C) 0,091			
11	SNP 9	(C/C) 0,292	(C/T) 0,708	(T/T) 0	(C/C) 0	(C/T) 1	(T/T) 0	(C/C) 0,167	(C/T) 0,722	(T/T) 0,111	(C/C) 0,789	(C/T) 0,211	(T/T) 0			
12	SNP 10	(C/C) 1	(C/T) 0	(T/T) 0	(C/C) 0,267	(C/T) 0,739	(T/T) 0	(C/C) 0,379	(C/T) 0,588	(T/T) 0,035	(C/C) 0,207	(C/T) 0,793	(T/T) 0			
13	SNP 11	(C/C) 1	(C/T) 0	(T/T) 0	(C/C) 0,288	(C/T) 0,712	(T/T) 0	(C/C) 0,370	(C/T) 0,593	(T/T) 0,037	(C/C) 0,273	(C/T) 0,722	(T/T) 0			
14	SNP 12	(T/T) 0,333	(T/G) 0,667	(G/G) 0	(T/T) 0	(T/G) 1	(G/G) 0	(T/T) 0	(T/G) 0,931	(G/G) 0,069	(T/T) 0,103	(T/G) 0,897	(G/G) 0			
15	SNP 13	(A/A) 1	(A/G) 0	(G/G) 0	(A/A) 0,043	(A/G) 0,217	(G/G) 0,739	(A/A) 0,104	(A/G) 0,241	(G/G) 0,655	(A/A) 0,207	(A/G) 0,341	(G/G) 0,448			
16	SNP 14	(A/A) 0	(A/G) 1	(G/G) 0	(A/A) 0,052	(A/G) 0,737	(G/G) 0,210	(A/A) 0,207	(A/G) 0,629	(G/G) 0,172	(A/A) 0,286	(A/G) 0,641	(G/G) 0,071			
17	SNP 15	(A/A) 0	(A/G) 0,667	(G/G) 0,333	(A/A) 0	(A/G) 0,869	(G/G) 0,131	(A/A) 0,069	(A/G) 0,75	(G/G) 0,172	(A/A) 0	(A/G) 0,897	(G/G) 0,104			
18	SNP 16	(A/A) 0,333	(A/G) 0,667	(G/G) 0	(A/A) 0,1	(A/G) 0,9	(G/G) 0	(A/A) 0,172	(A/G) 0,75	(G/G) 0,069	(A/A) 0,103	(A/G) 0,897	(G/G) 0			
19	SNP 17	(C/C) 0,84	(C/T) 0,16	(T/T) 0	(C/C) 0,958	(C/T) 0,042	(T/T) 0	(C/C) 0,793	(C/T) 0,207	(T/T) 0	(C/C) 1	(C/T) 0	(T/T) 0			
20	SNP 18	(C/C) 0,32	(C/G) 0,68	(G/G) 0	(C/C) 0,729	(C/G) 0,271	(G/G) 0	(C/C) 0,655	(C/G) 0,345	(G/G) 0	(C/C) 0,759	(C/G) 0,241	(G/G) 0			
21	SNP 19	(A/A) 1	(A/G) 0	(G/G) 0	(A/A) 1	(A/G) 0	(G/G) 0	(A/A) 1	(A/G) 0	(G/G) 0	(A/A) 1	(A/G) 0	(G/G) 0			
22	SNP 20	(A/A) 0,348	(A/G) 0,652	(G/G) 0	(A/A) 0	(A/G) 1	(G/G) 0	(A/A) 0	(A/G) 0,931	(G/G) 0,069	(A/A) 0,111	(A/G) 0,889	(G/G) 0			
23	SNP 21	(C/C) 0	(C/T) 0,333	(T/T) 0,667	(C/C) 0	(C/T) 0	(T/T) 1	(C/C) 0	(C/T) 0	(T/T) 1	(C/C) 0	(C/T) 0,038	(T/T) 0,962			
24	SNP 22	(A/A) 0,333	(A/C) 0,333	(C/C) 0,333	(A/A) 0	(A/C) 0	(C/C) 1	(A/A) 0	(A/C) 0	(C/C) 1	(A/A) 0,103	(A/C) 0,483	(C/C) 0,414			
25	SNP 23	(A/A) 0	(A/C) 0,60	(C/C) 0,40	(A/A) 0	(A/C) 0,787	(C/C) 0,217	(A/A) 0	(A/C) 0,829	(C/C) 0,173	(A/A) 0	(A/C) 0,173	(C/C) 0,827			
26	SNP 24	(A/A) 0	(A/T) 0,625	(T/T) 0,375	(A/A) 0	(A/T) 1	(T/T) 0	(A/A) 0,069	(A/T) 0,931	(T/T) 0	(A/A) 0	(A/T) 0,848	(T/T) 0,154			
27	SNP 25	(C/C) 0,526	(C/T) 0,474	(T/T) 0	(C/C) 0,210	(C/T) 0,789	(T/T) 0	(C/C) 0	(C/T) 1	(T/T) 0	(C/C) 0,154	(C/T) 0,848	(T/T) 0			
28	SNP 26	(A/A) 0	(A/G) 0,167	(G/G) 0,833	(A/A) 0,609	(A/G) 0,341	(G/G) 0,043	(A/A) 0,483	(A/G) 0,483	(G/G) 0,034	(A/A) 0,965	(A/G) 0,035	(G/G) 0			

Tabla 3.5. Frecuencias genotípicas para cada raza.

Para comprobar la ausencia de consanguinidad en los animales analizados en cada una de las cuatro razas caninas estudiadas se estimó el estadístico *Fis*. En la tabla 3.3 se presentan estos valores de *Fis*, para cada raza analizada. Como se indica en la tabla, todos ellos dieron valores negativos, indicando la ausencia de endocría en los animales estudiados.

Raza	<i>Fis</i>	IC (95%)
Cimarron Uruguayo	- 0,27243	(-0.47561 - -0.14080)
Collie	- 0,52382	(-0.63804 - -0.43738)
Labrador Retriever	- 0,33678	(-0.55718 - -0.14448)
Ovejero Alemán	- 0,41391	(-0.58617 - -0.29503)

Tabla 3.3. Valores de *Fis* para las cuatro razas estudiadas.

Para analizar la diversidad genética que presentan las cuatro razas estudiadas con respecto a los 26 marcadores analizados, se realizó un Análisis de Correspondencia. Este mide la distancia genética entre individuos o entre poblaciones, etc. y permite estudiar una variable cualitativa (raza) en función de otras (alelos). En este trabajo el análisis se efectúa a partir de una tabla de contingencia por raza en el que las filas están constituidas por la variable a explicar (raza) y las columnas el conjunto de variables explicativas (los distintos alelos de cada locus). En la figura 3.6 se representan las poblaciones considerando a todos los animales estudiados, de las cuatro razas. En esta figura puede verse como los perros cimarrones, representados en amarillo, se encuentran en una posición más alejada del resto de los animales de las otras razas. También puede observarse cómo los animales pertenecientes a las razas Collie, Labrador y Pastor Alemán, están mucho más mezclados entre ellos. Esto ya indica que la raza Cimarrón se encuentra más alejada genéticamente del resto de las otras tres razas analizadas. Cuando se analiza teniendo en cuenta a las razas (cada animal perteneciente a su raza) los resultados son los que se ven en la Figura 3.7, donde se indican las distancias genéticas existentes para las cuatro razas estudiadas. En esta figura se observa la mayor distancia genética para la población de

cimarrones respecto a las demás razas, las cuales también presentan diferencias genéticas entre sí, aunque menos marcadas.

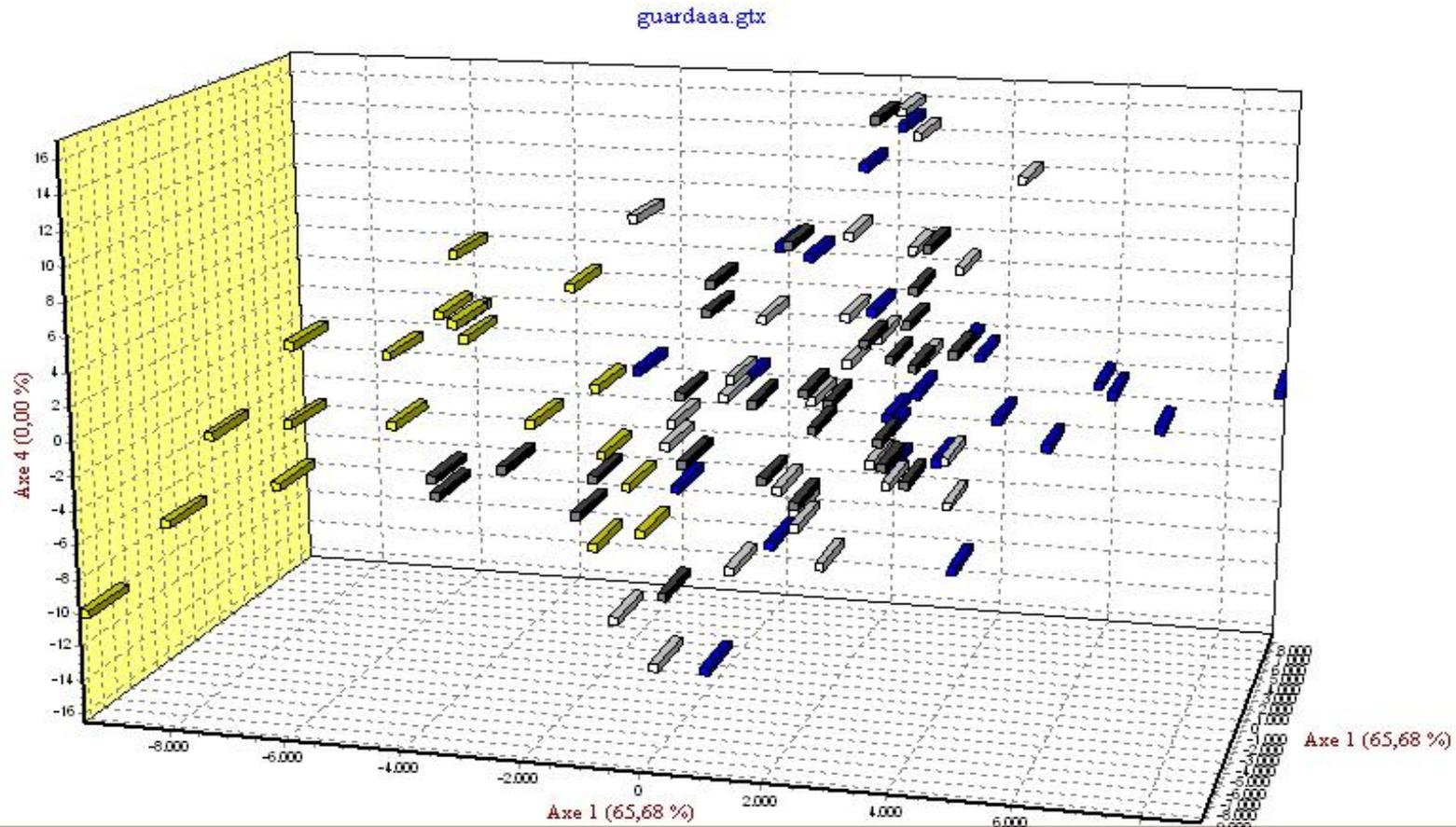


Figura 3.6. Distancia genética entre todos los animales estudiados.

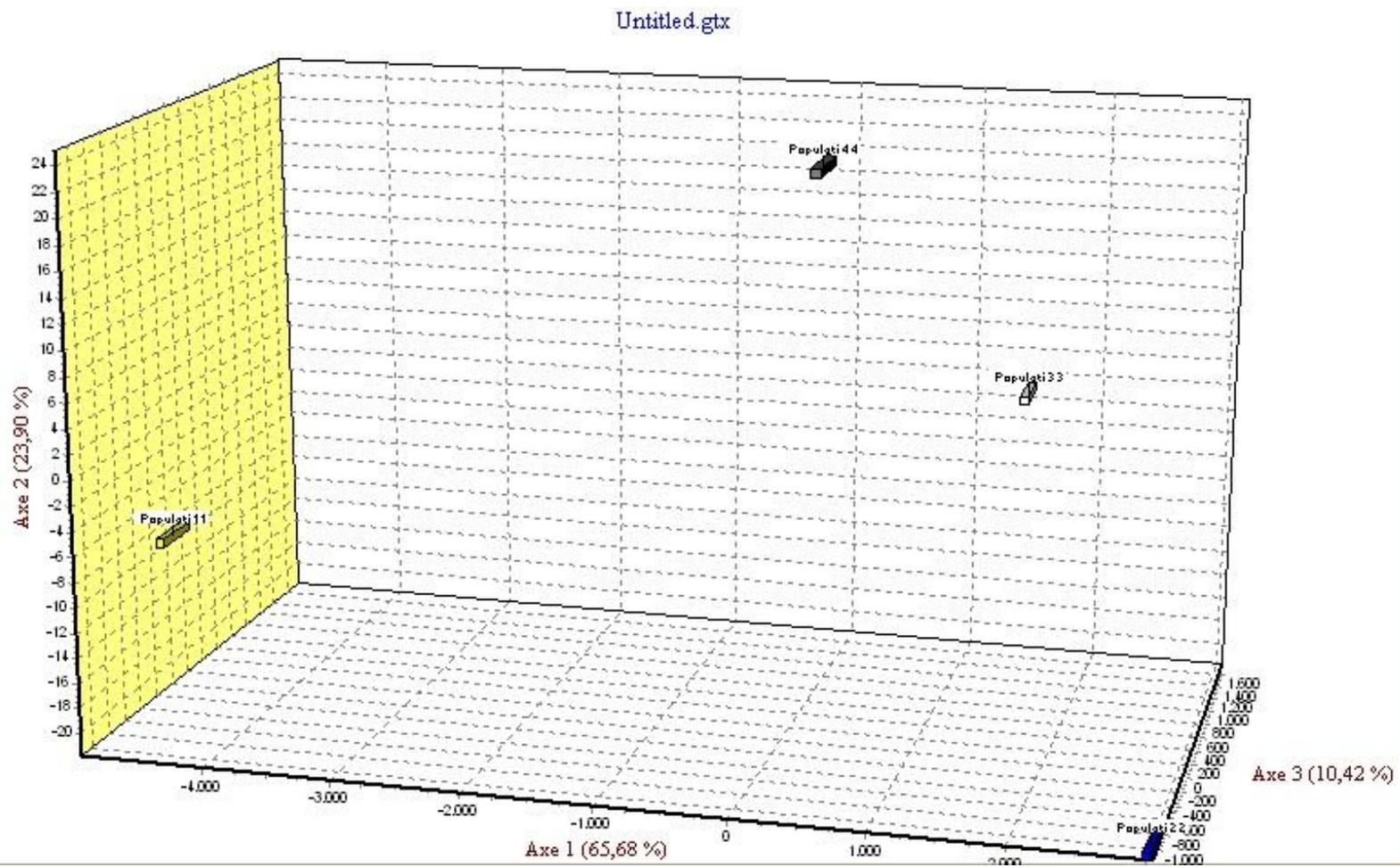


Figura 3.7. Distancia genética entre las cuatro razas estudiadas.

El análisis de los haplotipos y búsqueda de marcadores relacionados con el carácter a analizar se realizó con el programa *SNPStat*. El programa para comparar estos haplotipos lo hace tomando una de las razas como control, en este caso el Cimarrón Uruguayo ya que no se han identificado reacciones adversas a fármacos en esta raza. Para que pudiera ser empleada con este fin, se analizó si estaba en equilibrio. Se realizó un test de equilibrio Hardy-Weinberg, mediante el cual se pudo estimar que todos los loci resultaron estar en equilibrio. Cinco de ellos presentaron una probabilidad de $0,05 < P < 0,10$.

El programa informático toma los haplotipos más frecuentes como una categoría de referencia y los haplotipos “raros” se agrupan todos juntos.

El número de combinaciones posibles de haplotipos teóricamente serían 2^{26} , pero como se ha indicado con anterioridad, hay muchos factores que impiden la formación del máximo teórico, entre los cuales se encuentra el proceso de recombinación genética. De esta forma, con frecuencia mayor al 1% se identificaron 12 haplotipos en Cimarrón, 19 en Collie, 22 en Labrador y 18 en Pastor Alemán. Para cada una de las razas, el haplotipo más frecuente se toma como haplotipo 1. En la tabla 3.4 se muestran los dos haplotipos más frecuentes para cada raza. El resto de haplotipos en todos los casos fueron menores al 10%.

Raza	Haplotipo	SNPs	Frecuencia
Cimarrón	H1	ATG ATG ATC CCT AAG ACC AAT ACT CG	0,34
	H2	ATG ATA ATT CCG AGA GCG AGT CAA TG	0,2133
Collie	H1	ATG ATA ATT CCT GGG ACC AGT CAA CA	0,3219
	H2	ATG ATA GCC TTG GAA GCC AAT CCT TA	0,0903
Labrador	H1	ATG ATA ATC CCT GGG ACC AAT CAT CA	0,3621
	H2	ATG ATA ACC CCT GAG ACC AAT CCT CA	0,069
Ovejero	H1	ATG ATA ACC CCT GAG ACC AAT CCT CA	0,1653
	H2	ATG ATA ATC TTG GGA GCC AGT CCA TA	0,1328

Tabla 3.4. Haplotipos más frecuentes en cada raza.

Es importante ver que en la raza Cimarrón Uruguayo el haplotipo más frecuente, identificado como haplotipo 1 (Tabla 3.4), presenta una frecuencia de 0,34 indicando que el 34 % de todos los animales, es decir algo más un tercio de todos ellos, presentan este haplotipo. En el caso de la raza Collie, el haplotipo número 1, diferente al haplotipo número 1 de la raza Cimarrón, se presenta con una frecuencia de 0,3219, y en el caso de la raza Labrador, su haplotipo número 1, se presenta con una frecuencia de 0,3621. Como se observa en esta misma tabla, la raza Ovejero, presenta frecuencias mucho más bajas para cada haplotipo.

El análisis de asociación para cada SNP se realiza por variable de respuesta binaria, el análisis de regresión logística se resume con las frecuencias genotípicas, proporciones, **odds ratio (OR)** (cociente de probabilidades) y un intervalo de confianza (IC) de 95%. Este cociente de probabilidades u **odds ratio** es la razón entre la probabilidad de que el marcador esté relacionado con el carácter buscado (p) en este caso con la mayor sensibilidad a los fármacos, y la probabilidad de que no lo esté (1-p), es decir $OR = p/1-p$ (Gutiérrez & Camacho, 2012).

Todos esos datos se obtuvieron para todos los animales y todos los loci estudiados. Como ejemplo, en el Tabla 3.5 se muestran los resultados para el SNP9.

Asociación del SNP9 con el estado de respuesta (n=81, crude analysis)							
Modelo	Genotipo	status=0- Control	status=1- Case	OR (95% CI)	P- value	AIC	BIC
Codominante	C/C	(29.2%)	(31.6%)	1.00	0.47	102.9	110.1
	C/T	(70.8%)	(64.9%)	0.85 (0.30- 2.41)			
	T/T	0 (0%)	2 (3.5%)	NA (0.00- NA)			

Tabla 3.5.a. Asociación del SNP9 con el estado de respuesta.

Teniendo en cuenta que el **p value** o **valor de significancia**, busca probar que existe una diferencia real, por ejemplo entre los dos grupos estudiados: que esté asociado a la mayor sensibilidad a los fármacos (p) y que no esté relacionado con dicho carácter (1-p), y además que esta diferencia no es al azar. De forma arbitraria y por convenio, se adopta el valor del 5% o del 0.05 como límite. Cuanto menor sea la p, es decir, cuanto menor sea la probabilidad de que el azar pueda haber producido los resultados observados, mayor será la tendencia a concluir que la diferencia realmente existe. Si los resultados estadísticos son mayores a 0.05 no hay diferencia significativa y si los resultados estadísticos arrojan una p de 0.05 o menos, quiere decir que hay diferencia estadísticamente significativa. Ya que la hipótesis nula de la que se parte es que **no** hay asociación entre el marcador genético SNP y el carácter mayor sensibilidad a los fármacos. En el Tabla 3.5 b, se muestran los resultados obtenidos para la asociación del marcador genético SNP2 con el carácter buscado. En ella puede observarse cómo la diferencia es significativa, es decir $p < 0,05$, luego se rechaza la hipótesis nula de no asociación y se acepta que dicho marcador sí está asociado al carácter.

Asociación del SNP2 con el estado de respuesta (n=106, crude analysis)							
Modelo	Genotipo	status=0- Control	status=1- Case	OR (95% CI)	P- value	AIC	BIC
Codominante	T/T	(100%)	(86,4%)	1.00	0.043	115,5	123,5
	A/T	(0%)	(9.9%)	NA (0,00- NA)			
	A/A	(0%)	(3.7%)	NA (0.00- NA)			

Tabla 3.5b. Estudio de la asociación del SNP2 con el estado de respuesta.

Según los resultados obtenidos, hay 15 SNPs indicativos de sensibilidad a drogas: SNP2, SNP6, SNP8, SNP10, SNP11, SNP12, SNP13, SNP14, SNP18, SNP20, SNP21, SNP22, SNP24, SNP25 y SNP26. El marcador genético SNP2 pertenece el gen *ABCB1*; los marcadores SNP6, SNP8, SNP10, SNP11, SNP12, SNP13, SNP14, SNP18, SNP20, SNP21, SNP22, SNP24 y SNP25 corresponden al gen *CYP1A2* y por último, el marcador SNP26 pertenece al gen *CYP2B11*. Cualquiera de ellos puede considerarse candidato para estudiar sensibilidad a drogas.

Estimación de la frecuencia de los haplotipos (n=106)																												
	SNP 1	SNP 2	SNP 3	SNP 4	SNP 5	SNP 6	SNP 7	SNP 8	SNP 9	SNP 10	SNP 11	SNP 12	SNP 13	SNP 14	SNP 15	SNP 16	SNP 17	SNP 18	SNP 19	SNP 20	SNP 21	SNP 22	SNP 23	SNP 24	SNP 25	SNP 26	Total	group.0. Control
1	A	T	G	A	T	A	A	T	C	C	C	T	G	G	G	A	C	C	A	A	T	C	C	T	C	A	0.2186	NA
2	A	T	G	A	T	G	A	T	C	C	C	T	A	G	G	A	C	C	A	A	T	A	C	T	C	G	0.079	0.34
3	A	T	G	A	T	A	A	C	C	C	C	T	G	A	G	A	C	C	A	A	T	C	C	T	C	A	0.0627	NA
4	A	T	G	A	T	A	A	T	C	C	C	T	A	G	G	A	C	C	A	A	T	C	C	T	C	G	0.0302	NA
5	A	T	G	A	T	A	A	T	T	C	C	G	A	A	A	G	C	G	A	G	T	C	A	A	T	G	0.0285	0.2133
6	A	T	G	A	T	G	A	T	C	C	C	T	A	G	G	A	C	C	A	A	T	A	C	T	C	A	0.0274	NA
7	A	T	G	A	T	A	A	T	C	C	C	T	A	G	G	A	C	C	A	A	T	C	C	T	C	A	0.023	0.06
8	A	T	G	A	T	A	A	T	C	T	T	G	A	A	A	G	C	G	A	G	T	C	C	A	T	A	0.0196	NA
9	A	T	G	A	T	A	G	T	T	C	C	G	A	A	A	G	C	G	A	G	T	C	A	A	T	G	0.0192	0
10	A	T	G	A	T	G	A	T	C	C	C	T	A	A	G	A	C	C	A	A	C	A	C	T	C	G	0.0189	0.08
11	A	T	G	A	T	A	A	T	C	T	T	G	G	A	A	G	C	C	A	G	T	C	C	A	T	A	0.0183	NA
12	A	T	G	A	T	A	G	C	T	T	T	G	G	A	A	G	C	C	A	G	T	C	C	A	T	G	0.0174	NA
13	A	T	G	A	T	A	A	T	T	T	T	G	G	A	A	G	C	C	A	G	T	C	A	A	T	A	0.0174	NA
14	A	T	G	A	T	A	A	C	T	T	T	G	G	A	A	G	C	C	A	G	T	C	C	A	T	A	0.0155	NA
15	A	T	G	A	T	A	A	T	C	C	C	G	G	G	G	A	C	C	A	G	T	C	A	A	T	A	0.0146	NA
16	A	T	G	A	T	A	A	C	C	T	T	G	G	A	A	G	C	C	A	G	T	A	C	A	T	A	0.0123	NA
17	A	T	G	A	T	G	G	C	T	T	T	G	G	A	A	G	C	C	A	G	T	C	C	A	T	A	0.0119	NA
18	A	T	G	A	T	A	G	C	T	T	T	G	G	G	A	G	C	C	A	G	T	C	C	A	T	A	0.0117	NA
19	A	T	G	A	T	A	A	T	T	C	C	G	A	A	A	G	C	G	A	G	T	C	A	A	C	G	0.0117	0.03

Tabla 3.6. Frecuencia de cada haplotipo.

SN P1	SN P2	SN P3	SN P4	SN P5	SN P6	SN P7	SN P8	SN P9	SNP 10	SNP 11	SNP 12	SNP 13	SNP 14	SNP 15	SNP 16	SNP 17	SNP 18	SNP 19	SNP 20	SNP 21	SNP 22	SNP 23	SNP 24	SNP 25	SNP 26	Fre q.	OR (95 %)	p-value
A	T	G	A	T	A	A	T	C	C	C	T	G	G	G	A	C	C	A	A	T	C	C	T	C	A	0,17 71	1,00	--
A	T	G	A	T	G	A	T	C	C	C	T	A	G	G	A	C	C	A	A	T	A	C	T	C	G	0,08 0	0,0	1
A	T	G	A	T	A	A	C	C	C	C	T	G	A	G	A	C	C	A	A	T	C	C	T	C	A	0,06 4	0,14	1
A	T	G	A	T	A	A	T	C	C	C	T	A	G	G	A	C	C	A	A	T	C	C	T	C	G	0,04 63	0,0	1
A	T	G	A	T	A	A	T	T	C	C	G	A	A	A	G	C	G	A	G	T	C	A	A	T	G	0,03 29	0,05 7	1
A	T	G	A	T	G	A	T	C	C	C	T	A	G	G	A	C	C	A	A	T	A	C	T	C	A	0,03 07	0,00 3	1

Tabla 3.7. Asociación de los haplotipos con respuesta.

DISCUSIÓN

Existen numerosos trabajos en genes involucrados en la respuesta de los animales a los tratamientos farmacológicos. Entre estos genes, de los más estudiados son el gen *MDR1* de la superfamilia de transportadores de membrana ABC y los genes involucrados en el metabolismo farmacológico como ser el *CYP2B11* y el *CYP1A2* de la superfamilia del citocromo P450 (Wenker, 2009; Mealey, 2006; Trepanier, 2006; Kamimura *et al.*, 2006; Mise *et al.*, 2004; Neff *et al.*, 2004). El análisis de estos genes se fue dando al ver en qué forma inciden en los caninos en la respuesta farmacológica, encontrándose relacionados a gran número de fármacos empleados ampliamente en la Clínica Veterinaria.

En los genes estudiados diversos autores comunicaron polimorfismos asociados a un cambio funcional de las proteínas producto:

- En lo que se refiere al gen *MDR1*, la mutación *mdr1-1Δ*, es responsable de que a numerosas razas caninas no se le puedan administrar determinados fármacos. Por otra parte, es un gen relacionado a la falta de respuesta con tratamientos antitumorales, hecho muy estudiado en humanos. Distintos autores están estudiando este punto en caninos (Gramer *et al.*, 2013; Nakaichi *et al.*, 2007). Mizukami describe un SNP asociado a la resistencia al tratamiento con fenobarbital en perros de raza Border Collie que presentan epilepsia idiopática.
- En lo que respecta al gen *CYP1A2*, se conocen diferentes cambios puntuales en el mismo. En particular, diversos autores han estudiado el SNP *CYP1A2* 1117 C>T, causante de una proteína no funcional, dado que se trata de una mutación sin sentido, produciéndose un codón stop prematuro (Whiterock *et al.*, 2007; Mise *et al.*, 2004; Tenmizu *et al.*, 2004).
- Wenker describe diversos SNPs en el gen *CYP2B11*, tres de ellos en regiones codificantes mientras que dos de ellos se ubican en intrones. La particularidad de este trabajo es que encuentra diferencias entre razas.

En este trabajo se estudiaron 26 SNPs pertenecientes a los tres genes mencionados (*MDR1*, *CYP1A2* y *CYP2B11*) en 120 animales de cuatro razas diferentes. De los 30 animales que se estudió el genotipo en cada una de las cuatro razas, efectivamente se obtuvo el genotipo de 25 Cimarrones, 23 Collie, 29 Labradores y 29 Ovejeros Alemanes. El primer elemento a considerar en los resultados obtenidos es la diferencia en las frecuencias genotípicas en cada raza. Particularmente se nota la cantidad de

SNPs fijados en cada una de ellas, siendo la que presenta más SNPs en esta situación el Cimarrón, con diez de los marcadores monomórficos. Por otra parte, respecto de los estudios de distancia genética, esta raza es la que se encuentra más alejada. La particularidad que tiene el Cimarrón Uruguayo con respecto a las otras tres razas estudiadas es que es una raza más “nueva”, reconocida por la FCI más recientemente. El interés de criar animales de la raza ha crecido notoriamente en los últimos años, por lo que es relativamente reciente la selección intensiva en estos perros. El Collie, el Labrador y el Ovejero son razas que llevan más tiempo siendo seleccionadas. De todas formas, las cuatro razas se diferencian bien, lo que es previsible si se considera que los cruzamientos se dan entre perros de la misma raza, seleccionando por características intrínsecas a la raza que corresponda. A esto se suma el hecho de que las cuatro razas son bien diferentes. Las únicas dos que están dentro del mismo grupo son el Collie y el Ovejero Alemán, dentro del grupo de los perros pastores. Sin embargo, presentan diferencias importantes entre ellas, el Collie es una raza británica, mientras que el Ovejero Alemán es una raza continental.

Otro enfoque de este trabajo fue empleando diferentes programas estadísticos con el fin de analizar si alguno de los SNPs es candidato como para estudiar la posible asociación con la respuesta a fármacos. Dado que los 26 SNPs trabajados pertenecen a tres genes, se trabajó también con haplotipos. Cuando se estudian las posibles interacciones con los haplotipos en lugar de con SNPs independientes, se contribuye notablemente al análisis genético epidemiológico (Solé *et al.*, 2006). De estos análisis surgió que 15 de los 26 SNPs estudiados pueden ser candidatos a estudio de las diferencias en la respuesta farmacológica. Para realizar estos estudios, de las razas estudiadas, el Cimarrón Uruguayo se usó como control por no haberse identificado en ellos respuestas adversas a fármacos. Con estos animales se compararon las otras razas estudiadas (Collie, Labrador Retriever, Pastor Alemán).

Los diferentes resultados obtenidos revisten un gran interés dado que se estudiaron cuatro razas caninas no relacionadas entre sí. Una de ellas es la única raza canina autóctona de nuestro país. La mayoría de los estudios que se realizan a nivel internacional son en la raza Beagle, por lo que hay poca información de otras razas. La especie canina presenta un interés particular por las grandes diferencias que hay entre muchas de las más de 400 razas reconocidas a nivel mundial. Por otra parte, si se considera que es una de las pocas especies de interés veterinario que completa su ciclo vital, contrariamente a lo que sucede con las especies productivas, es una de las especies (sin considerar roedores) que más se usa como modelo de lo que sucede en

humanos. Esto pasa tanto en la industria farmacéutica como también en lo que respecta a enfermedades.

ANEXO 1. RESULTADOS DE GENOTIPOS.

CIMARRÓN URUGUAYO

Sample ID	26 CR	SNP_ID	ABCB1A_G	ABCB1A_T	ABCB1cA_G1	ABCB1cA_G2	ABCB1cG_T	CYP1A2-1A_C	CYP1A2-1A_G	CYP1A2-1C_C	CYP1A2-1C_G	CYP1A2-1G_C	CYP1A2-2A_C	CYP1A2-2A_G	CYP1A2-2A_C	CYP1A2-2C_C	CYP1A2-2G_C	CYP1A2a-A_C	CYP1A2a-A_G	CYP1A2aC_T	CYP1A2bA_C	CYP1A2bA_G	CYP1A2bC_T	CYP2B6					
1	25	96.15%	A	T	G	A	T		GA	C	CT	CT	TC	GT	GA	GA	GA	AG	CT	GC	A	GA	T	C	CA	TA	CT	A	
2	23	88.46%	A	T	G	A	T		GA		CT	C	C	GT	G	G	G	A	C	C	A	GA	T	C	CA	TA		AG	
34	26	100.00%	A	T	G	A	T	A	A	CT	CT	CT	TC	GT	GA	GA	GA	AG	C	GC	A	GA	T	C	CA	TA	CT	A	
35	25	96.15%	A	T	G	A	T	A	GA	CT	CT	C	C	GT	A	GA	GA	AG	CT	GC	A	GA	T	C	CA	TA		AG	
40	24	92.31%	AG	T	GA	GA	GT	A		CT	CT	CT	TC	GT	G	GA	GA	AG	C	C		GA	T	C	CA	TA	CT	A	
41	23	88.46%	A	T	G	A	T	A		C	CT	CT		GT	GA	A	GA	AG	CT	GC		GA	T	C	CA	TA	CT	A	
CH1	23	88.46%	A	T	G	A	T		A		CT	CT	TC	GT	G		GA	AG	C	C	A	GA	T	C	CA	TA	CT	A	
CH4	26	100.00%	A	T	G	A	T	A	GA	C	CT	CT	TC	GT	GA	A	GA	AG	CT	GC	A	GA	T	C	CA	TA	CT	A	
CH6	24	92.31%	A	T	G	A	T	A	GA	CT	CT	CT	TC	GT	G		GA	AG	C	C	A	GA	T	C	CA	TA		A	
CH7	25	96.15%	A	T	G	A	T		GA	CT	CT	CT	TC	GT	G	GA	GA	AG	C	C	A	GA	T	C	CA	TA	CT	AG	
CH8	25	96.15%	AG	T	GA	GA	GT	A	A	CT	CT	CT	TC	GT	G	GA	GA		C	C	A	GA	T	C	CA	TA	CT	A	
CI2	21	80.77%	A	T	G	A	T		GA	CT	CT	C	C	GT	G	G	G		C	C	AG				CA	TA	C	AG	
CI20	24	92.31%	A	T	G	A	T	GA		CT	CT	CT	TC	GT	G		GA	AG	C	C	A	GA	T	C	CA	TA	CT	A	
CI22	25	96.15%	A	T	G	A	T		GA	CT	CT	CT	TC	GT	GA	GA	GA	AG	C	GC	A	GA	T	C	CA	TA	CT	AG	
CI23	23	88.46%	A	T	G	A	T				CT	C	C	GT	G	G	G	A	C	C	A	GA	T	C	CA	TA	C	AG	
CI25	26	100.00%	A	T	G	A	T	A	GA	C	CT	CT	TC	GT	G	GA	GA	AG	C	C	A	GA	T	C	C	TA	CT	A	
CI26	25	96.15%	G	T	A	G	G	A		C	CT	CT	TC	GT	G	GA	GA	AG	C	C	A	GA	T	C	C	TA	CT	A	
CI27	25	96.15%	AG	T	GA	GA	GT	A		CT	CT	CT	TC	GT	G	GA	GA	AG	C	C	A	GA	T	C	CA	TA	CT	A	
CI29	19	73.08%	A	AT	G	A	T		A		CT	CT		GT	G	G	GA		C	C	AG		T	C	CA	TA		A	
CI30	25	96.15%	AG	T	GA	GA	GT	A		CT	CT	CT	TC	GT	G	GA	GA	AG	C	C	A	GA	T	C	CA	TA	C	A	
CI31	23	88.46%	A	T	G	A	T	A			C	C	C	GT	GA	GA	GA	AG	C	GC	A	GA	T	C	CA	TA	C	G	
CI32	24	92.31%	A	T	G	A	T	A			CT	C	C	GT	A	GA	GA	AG	C	GC	A	GA	T	C	CA	TA	CT	A	
CI33	23	88.46%	A	T	G	A	T	A		C	CT	CT	TC	GT	G		GA	AG	C	C	A	GA	T	C	C	TA	CT	A	
CI36	25	96.15%	AG	T	GA	GA	GT	A		CT	CT	CT	TC	GT	GA	GA	GA	AG	C	GC	A	GA	T	C	CA	TA	CT	AG	
CI38	5	19.23%		T												A				G			T						
CI39	24	92.31%	AG	T	GA	GA	GT	A	GA	CT	CT	CT		GT	G	GA	GA	AG	C	C	AG		T	C	CA	TA	CT	A	
CI4	23	88.46%	A	T	G	A	T		A		CT	CT	TC	GT	G	GA	GA	AG	C		A	GA	T	C	C	TA	CT	A	
CI50	24	92.31%	A	T	G	A	T	A		T	CT	C	C	GT	GA	GA	GA	AG	C	GC	A	GA	T	C	CA	TA		AG	
CI7	25	96.15%	A	T	G	A	T		GA	C	CT	CT	TC	GT	G	GA	GA	AG	C	C	A	GA	T	C	C	TA	CT	AG	
CI8	23	88.46%	A	T	G	A	T	A			CT	C	C	GT	G	G	G	A	C	C	A	GA	T	C	CA	TA		AG	

ANEXO 1. RESULTADOS DE GENOTIPOS (CONTINUACIÓN).

COLLIE

Sample ID	26 CR	SNP_ID	ABC81A_G	ABC81A_T	ABC81cA_G1	ABC81cA_G2	ABC81cG_T	CYP1A2-1A_CYP1A2-1A	CYP1A2-1C_CYP1A2-1C	CYP1A2-1C_CYP1A2-1C	CYP1A2-1C_CYP1A2-1G	CYP1A2-2A_CYP1A2-2A	CYP1A2-2A_CYP1A2-2A	CYP1A2-2A_CYP1A2-2C	CYP1A2-2C_CYP1A2-2G	CYP1A2a-A_CYP1A2a-A	CYP1A2aC_CYP1A2aC	CYP1A2bA_CYP1A2bA	CYP1A2bA_CYP1A2bA	T_CYP1A2bC	T_CYP2B6							
C10	24	92.31%	A	T	G	A	T	A	A	CT	C	GT	A	GA	GA	AG	C	GC	A	GA	T	C	CA	TA	CT	AG		
C11	25	96.15%	A	T	G	A	T	GA	A	T	CT	C	GT	A	GA	GA	AG	C	GC	A	GA	T	CA	CA	TA	CT	G	
C12	26	100.00%	A	T	G	A	T	GA	A	T	CT	C	C	GT	A	GA	GA	AG	C	GC	A	GA	T	CA	CA	TA	CT	G
C13	11	42.31%	A	T		A						C		C		GA			C	A		T						
C14	25	96.15%	A	T	G	A	T	A		T	CT	C	C	GT	A	GA	GA	AG	C	GC	A	GA	T	C	CA	TA	CT	AG
C15	11	42.31%				GA		A			CT	CT	TC						GC	A		T	CA	CA	TA		AG	
C16	24	92.31%	A	T	G	A	T		GA		CT	C	C	GT	A	GA	GA	AG	C	GC	A	GA	T	C	CA	TA	CT	G
C17	25	96.15%	A	T	G	A	T	GA		T	CT	C	C	GT	A	GA	GA	AG	C	GC	A	GA	T	CA	CA	TA	CT	G
C18	25	96.15%	A	T	G	A	T	A	GA		CT	C	C	GT	A	GA	GA	AG	C	GC	A	GA	T	C	CA	TA	CT	G
C19	26	100.00%	A	T	G	A	T	G	A	T	CT	C	C	T	A	GA	G	A	C	C	A	A	CT	A	C	T	C	G
C20	26	100.00%	A	T	G	A	T	G	A	T	CT	C	C	T	A	GA	G	A	C	C	A	A	CT	A	C	T	C	G
C21	26	100.00%	A	T	G	A	T	G	A	T	CT	C	C	T	A	GA	G	A	C	C	A	A	T	A	C	T	C	G
C22	25	96.15%	A	T	G	A	T	A	GA		CT	C	C	GT	A	GA	GA	AG	C	GC	A	GA	T	C	CA	TA	CT	G
C23	26	100.00%	A	T	G	A	T	GA	A	T	CT	C	C	GT	A	GA	GA	AG	C	GC	A	GA	T	CA	CA	TA	C	G
C24	24	92.31%	A	T	G	A	T		A	T	CT	C	C	GT	A	GA	GA	AG	C	GC	A	GA	T	CA	CA	TA		G
C25	26	100.00%	A	T	G	A	T	A	A	T	C	C	C	GT	A	GA	GA	AG	C	GC	A	GA	T	C	CA	TA	CT	AG
C26	24	92.31%	A	T	G	A	T	G	A	T	CT	C		GT	A	GA	GA	AG	CT	GC	A	GA	CT	CA	CA	TA		G
C27	24	92.31%	A	T	G	A	T	A		T	CT	C	C	GT	A	GA	GA	AG	CT	GC	A	GA	T	C	CA	TA		AG
C28	26	100.00%	A	T	G	A	T	G	A	T	CT	C	C	GT	A	GA	GA	AG	CT	GC	A	GA	CT	CA	CA	TA	C	G
C29	24	92.31%	A	T	G	A	T	A		T	CT	C	C	GT	A	GA	GA	AG	CT	GC	A	GA	T	C	CA	TA		G
C30	26	100.00%	A	T	G	A	T	G	A	T	C	C	C	T	A	GA	G	A	C	C	A	A	CT	A	C	T	C	G
C31	26	100.00%	A	T	G	A	T	G	A	T	C	C	C	T	A	GA	G	A	C	C	A	A	T	A	C	T	C	G
C32	26	100.00%	A	T	G	A	T	G	A	T	C	C	C	T	A	GA	G	A	C	C	A	A	CT	A	C	T	C	G
C33	22	84.62%	A	T	G	A	T		A	T	C	C	C	GT	A	GA	GA	AG	C	GC	A		CA	C	T		G	
C34	26	100.00%	A	T	G	A	T	G	A	T	C	C	C	T	A	GA	G	A	C	C	A	A	CT	A	C	T	C	G
C35	26	100.00%	A	T	G	A	T	G	A	T	C	C	C	T	A	GA	G	A	C	C	A	A	CT	A	C	T	C	G
C36	5	19.23%									CT	TC									A		GA	T				
C7	13	50.00%				GA		A		GA										CT	GC	A		CA	CA	TA	CT	AG
C8	12	46.15%				GA		A		T	CT	TC								GC	A		T	CA	CA	TA		AG
C9	12	46.15%				GA		A		T	CT	TC								CT	GC	A		CA	CA		CT	AG

ANEXO 1. RESULTADOS DE GENOTIPOS (CONTINUACIÓN).

LABRADOR RETRIEVER

Sample ID	26 CR	SNP_ID	ABC1A_G	ABC1A_T	ABC1cA_G1ABC1cA_G2ABC1cG_T	CYP1A2-1A_CYP1A2-1A_CYP1A2-1C_CYP1A2-1C_CYP1A2-1C_CYP1A2-1G_CYP1A2-2A_CYP1A2-2A_CYP1A2-2A_CYP1A2-2A_CYP1A2-2C_CYP1A2-2G_CYP1A2a-A_CYP1A2a-A_CYP1A2aC_CYP1A2bA_CYP1A2bA_CYP1A2bA_T_CYP1A2bC_CYP2B6																						
L1	25	96.15%	A	T	G	A	T	A	T	CT	C	C	GT	GA	GA	GA	AG	CT	GC	A	GA	T	C	CA	TA	CT	AG	
L10	24	92.31%	A	T	G	A	T	A	A	C	CT		GT	G	GA	GA	AG	C	C	A	GA	T	C	CA	TA	CT	A	
L11	25	96.15%	A	T	G	A	T	A	C	CT	CT	TC	GT	G	A	GA	AG	C	C	A	GA	T	C	C	TA	CT	AG	
L12	25	96.15%	A	T	G	A	T	G	G	T	CT	TC	G	A	A	A	G	CT	GC	A	G	T	C	CA	A	CT	G	
L13	26	100.00%	A	T	G	A	T	A	A	T	C	C	C	GT	G	G	A	C	C	A	GA	T	C	CA	TA	CT	AG	
L14	26	100.00%	A	T	G	A	T	G	G	C	T	T	T	G	G	A	G	C	C	A	G	T	C	C	A	CT	A	
L15	24	92.31%	AG	T	G	A	T	A	A		CT	TC	GT	G	GA	GA	AG	C	C	A	GA	T	C	CA	TA	CT	A	
L16	25	96.15%	A	T	G	A	T		GA	C	CT	CT	TC	GT	G	A	GA	AG	C	C	A	GA	T	C	C	TA	CT	AG
L17	24	92.31%	A	T	G	A	T	A			CT	C	C	GT	G	G	G	A	C	C	A	GA	T	C	CA	TA	CT	AG
L18	24	92.31%	A	T	G	A	T		GA		CT	CT	TC	GT	GA	GA	AG	C	GC	A	GA	T	C	CA	TA	CT	AG	
L19	25	96.15%	A	T	G	A	T	A	A	T	C	C		GT	G	G	A	C	C	A	GA	T	C	CA	TA	CT	A	
L2	25	96.15%	A	T	G	A	T	A		T	CT	C	C	GT	GA	GA	AG	CT	GC	A	GA	T	C	CA	TA	CT	AG	
L20	24	92.31%	A	T	G	A	T	A		T		C	C	GT	GA	GA	AG	CT	GC	A	GA	T	C	CA	TA	CT	A	
L21	23	88.46%	A	T	G	A	T	A			CT	C	C	GT	A	GA	AG	CT	GC	A	GA	T	C	CA	TA	CT	AG	
L22	24	92.31%	A	T	G	A	T	A	A			CT	TC	GT	GA	GA	AG	C	GC	A	GA	T	C	CA	TA	CT	A	
L23	26	100.00%	A	T	G	A	T	A	A	T	CT	CT	TC	GT	GA	GA	AG	C	GC	A	GA	T	C	CA	TA	CT	AG	
L24	24	92.31%	A	T	G	A	T	A	A	T	CT	C	C	GT	A	GA	AG	CT	GC	A	GA	T	C	CA	TA	CT	A	
L25	25	96.15%	A	T	G	A	T	A	A	T		C	C	GT	G	G	G	A	C	C	A	GA	T	C	CA	TA	CT	A
L26	24	92.31%	A	T	G	A	T				CT	CT	TC	GT	G	GA	AG	C	C	A	GA	T	C	CA	TA	CT	A	
L27	25	96.15%	A	T	G	A	T	A	A	T		C	C	GT	G	G	A	C	C	A	GA	T	C	CA	TA	CT	A	
L28	24	92.31%	A	T	G	A	T	A		T		CT	TC	GT	G	GA	AG	C	C	A	GA	T	C	CA	TA	CT	AG	
L29	24	92.31%	A	T	G	A	T	A		T		CT	TC	GT	G	GA	AG	C	C	A	GA	T	C	CA	TA	CT	A	
L3	23	88.46%	A	T	G	A	T			CT		CT	TC	GT	G	A	AG	C	C	A	GA	T	C	C	TA	CT	AG	
L30	25	96.15%	A	T	G	A	T	A				C	C	GT	GA	GA	AG	C	GC	A	GA	T	C	CA	TA	CT	AG	
L4	11	42.31%						A	GA	T		TC	GT	G		GA				A	GA	T			TA	CT		
L5	23	88.46%	A	T	G	A	T		GA			CT	TC	GT	G	GA	AG	C	C	A	GA	T	C	CA	TA	CT	A	
L6	24	92.31%	A	T	G	A	T	A	A			CT	TC	GT	G	GA	AG	C	C	A	GA	T	C	CA	TA	CT	AG	
L7	24	92.31%	A	T	G	A	T		GA			CT	TC	GT	G	GA	AG	C	C	A	GA	T	C	CA	TA	CT	AG	
L8	24	92.31%	AG	T	G	A	T	A		T		CT	TC	GT	G	GA	AG	C	C	A	GA	T	C	CA	TA	CT	A	
L9	24	92.31%	A	T	G	A	T			C	CT	CT	TC	GT	G	A	AG	C	C	A	GA	T	C	C	TA	CT	A	

ANEXO 1. RESULTADOS DE GENOTIPOS (CONTINUACIÓN).

OVEJERO ALEMÁN

Sample ID	26 CR	SNP_ID	ABC81A_G	ABC81A_T	ABC81cA_G1ABC81cA_G2ABC81cG_T	CYP1A2-1A_CYP1A2-1A_CYP1A2-1C_CYP1A2-1C_CYP1A2-1C_CYP1A2-1G_CYP1A2-2A_CYP1A2-2A_CYP1A2-2A_CYP1A2-2A_CYP1A2-2C_CYP1A2-2G_CYP1A2a-A_CYP1A2a-A_CYP1A2aC_CYP1A2bA_CYP1A2bA_CYP1A2bA_T_CYP1A2bC_CYP2B6																						
OA1	25	96.15%	A	T	G	A	T	A	A	CT	CT	TC	GT	G	A	GA	AG	C	C	A	GA	T	C	C	TA	CT	A	
OA10	25	96.15%	A	AT	G	A	T	GA		T	CT	C	C	GT	A	GA	GA	AG	C	GC	A	GA	T	CA	CA	TA	CT	A
OA11	25	96.15%	A	AT	G	A	T		GA	CT	CT	CT	TC	GT	G	GA	GA	AG	C	C	A	GA	T	CA	C	TA	CT	A
OA12	24	92.31%	A	T	G	A	T		GA	CT	CT	CT	TC	GT	G	A	GA	AG	C	C	A	GA	T	C	C	TA	CT	A
OA13	25	96.15%	A	T	G	A	T	A	A		C	CT	TC	GT	GA	A	GA	AG	C	GC	A	GA	T	C	C	TA	CT	A
OA14	25	96.15%	A	T	G	A	T	A	A		C	CT	TC	GT	G	GA	GA	AG	C	C	A	GA	T	C	CA	TA	CT	A
OA15	23	88.46%	A	AT	G	A	T	A	A	T	C	CT		GT	GA	GA	GA	AG	C	C	A	GA	T	CA	C		CT	A
OA16	25	96.15%	A	T	G	A	T	A	A		C	CT	TC	GT	G	GA	GA	AG	C	C	A	GA	T	CA	C	TA	CT	A
OA17	25	96.15%	A	T	G	A	T	A	A	CT		CT	TC	GT	G	GA	GA	AG	C	C	A	GA	T	CA	C	TA	CT	A
OA18	24	92.31%	A	T	G	A	T	A	A	T	C	CT		GT	GA	GA	GA	AG	C	C	A	GA	T	CA	C	TA	CT	A
OA19	25	96.15%	A	T	G	A	T	A	A		C	CT	TC	GT	G	GA	GA	AG	C	C	A	GA	T	C	C	TA	CT	A
OA2	25	96.15%	A	T	G	A	T	A	A	T	C	CT		GT	GA	GA	GA	AG	C	GC	A	GA	T	C	CA	TA	CT	A
OA20	24	92.31%	A	A	G	A	T	A	A			CT	TC	GT	G	A	GA	AG	C	C	A	GA	T	C	C	TA	CT	A
OA21	23	88.46%	A	AT	G	A	T	GA	A	T		CT		GT	GA	GA	GA	AG	C	C	A	GA	T	CA	C	TA		A
OA22	26	100.00%	A	AT	G	A	T	G	A	T	C	C	C	T	A	GA	G	A	C	C	A	A	T	A	C	T	C	A
OA23	25	96.15%	A	T	G	A	T	G	A	T	C	C	T	A	GA	G	A	C	C	A	A	T	A	C	T	C	A	
OA24	25	96.15%	A	T	G	A	T	G	A	T	C	C	T	A	GA	G	A	C	C	A	A	T	A	C	T	C	A	
OA25	25	96.15%	A	T	G	A	T	A	A	C		CT	TC	GT	G	A	GA	AG	C	C	A	GA	T	C	C	TA	CT	A
OA26	26	100.00%	A	T	G	A	T	A	A	CT	C	CT	TC	GT	GA	A	GA	AG	C	GC	A	GA	T	C	C	TA	CT	A
OA27	24	92.31%	A	T	G	A	T	A	A			CT	TC	GT	G	GA	GA	AG	C	C	A	GA	T	C	CA	TA	CT	A
OA28	24	92.31%	A	A	G	A	T	G	GA		T	C	C	C	GT	A	GA	GA	AG	C	GC	A	GA	T	CA	C	C	A
OA29	24	92.31%	A	T	G	A	T	A			C	CT	TC	GT	G	A	GA	AG	C	C	A	GA	T	C	C	TA	CT	AG
OA3	10	38.46%						A		CT			TC	GT	GA		GA					GA	T			TA	CT	
OA30	24	92.31%	A	T	G	A	T	A		CT		CT	TC	GT	G	GA	GA	AG	C	C	A	GA	T	CA	C	TA	CT	A
OA4	22	84.62%	A	T	G	A	T	GA	A	T	C	CT		GT	GA	GA	GA	AG	C	C	A		CA	C		CT	A	
OA5	25	96.15%	A	T	G	A	T		A	T	C	CT	TC	GT	G	GA	GA	AG	C	C	A	GA	T	CA	C	TA	CT	A
OA6	25	96.15%	A	T	G	A	T	A	A		C	CT	TC	GT	GA	A	GA	AG	C	GC	A	GA	T	C	C	TA	CT	A
OA7	25	96.15%	A	AT	G	A	T	GA	A	T	C	CT		GT	GA	GA	GA	AG	C	C	A	GA	T	CA	C	TA	CT	A
OA8	21	80.77%	A	AT	G	A	T		A	T	C	CT		GT	GA		GA	AG	C	C	A		CT	CA	C	T		A
OA9	24	92.31%	A	A	G	A	T	GA		T	CT	C	C	GT	A	GA	GA	AG	C	GC	A	GA	T	CA	CA	TA		A

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS (CAPÍTULO 3)

- Baratta M, Zaya M, White J, Locuson C. (2009) Canine CYP2B11 metabolizes and is inhibited by anesthetic agents often co-administered in dogs. *J. vet. Pharmacol. Therap.* 33: 50-55
- Bogaards J, Bertrand M, Jackson P, Oudshoorn M, Weavers R, van Bladeren P, Walther B. (2000) Determining the best animal model for human cytochrome P450 activities: a comparison of mouse, rat, rabbit, dog, micropig, monkey and man. *Xenobiotica* 30: 1131-1152
- Dean M, Rzhetsky A, Allikmets R. (2001) The Human ATP-Binding Cassette (ABC) Transporter Superfamily. *Genome Res.* 11: 1156-1166
- Fleischer S, Sharkey M, Mealey K, Ostrander E, Martinez M. (2007) Pharmacogenetic and Metabolic Differences Between Dog Breeds: Their Impact on Canine Medicine and the Use of the Dog as a Preclinical Animal Model. *The AAPS Journal* 10: 110-119
- Gramer I, Kessler M, Geyer J. (2013) Determination of MDR1 gene expression for prediction of chemotherapy tolerance and treatment outcome in dogs with lymphoma. *Veterinary and Comparative Oncology* DOI 10.1111/vco. 12051
- Gutiérrez HA, Camacho RE. 2012. Asociación de polimorfismos de nucleótido simple y de haplotipos para el gen de la Leptina con la ganancia de peso en la raza bovina blanco orejinegro usando técnicas bayesianas. *Comunicaciones en Estadística* 5 (1): 33-53.
- Iniesta R, Guinó E, Moreno V. 2005. Análisis estadístico de polimorfismos genéticos en estudios epidemiológicos. *Gac Sanit.* 19 (4): 333-341.
- Kamimura H. (2006) Genetic polymorphism of cytochrome P450s in beagles: possible influence of CYP1A2 deficiency on toxicological evaluations. *Arch Toxicol* 80: 732-738
- Loh, PR, Lipson M, Patterson N, Moorjani P, Pickrell JK, Reich D, Berger B. 2013. Inferring admixture histories of human populations using linkage disequilibrium. *Genetics* 193 (4): 1233-1254.

- Martignoni M, Groothuis G, de Kanter R. (2006) Species differences between mouse, rat, dog, monkey and human CYP-mediated drug metabolism, inhibition and induction. *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology* 2: 875-894
- Mealey K, Bentjen S, Gay J, Cantor G. (2001) Ivermectin sensitivity in collies is associated with a deletion mutation of the *mdr1* gene. *Pharmacogenetics* 11: 727-733
- Mealey K. (2006) Pharmacogenetics. *Vet. Clin. Small Anim.* 36: 961-973
- Mise M, Hashizume T, Matsumoto S, Terauchi Y, Fujii T. (2004) Identification of non-functional allelic variant of *CYP1A2* in dogs. *Pharmacogenetics* 14: 769-773
- Mizukami K, Yabuki A, Chang H-S, Uddin M, Rahman M, Kushida K, Kohyama M, Yamato O. (2013) High Frequency of a Single Nucleotide Substitution (c.-6-180T>G) of the Canine *MDR1/ABCB1* Gene Associated with Phenobarbital-Resistant Idiopathic Epilepsy in Border Collie Dogs. Hindawi Publishing Corporation. *Disease Markers* 35: 669-672
- Nakaichi M, Takeshita Y, Okuda M, Nakamoto Y, Itamoto K, Une S, Sasaki N, Kadosawa T, Takahashi T, Taura Y. (2007) Expression of the *MDR1* Gene and P-Glycoprotein in Canine Mast Cell Tumor Cell Lines. *J. Vet. Med. Sci.* 69: 111-115
- Neff M, Robertson K, Wong A, Safra N, Broman K, Slatkin M, Mealey K, Pedersen N. (2004) Breed distribution and history of canine *mdr1-1Δ*, a pharmacogenetic mutation that marks the emergence of breeds from the collie lineage. *PNAS* 101: 11725-11730
- Nishimuta H, Nakagawa T, Nomura N, Yabuki M. (2013) Species differences in hepatic and intestinal metabolic activities for 43 human cytochrome P450 substrates between humans and rats or dogs. *Xenobiotica Early Online* 1-8
- Reich DE, Cargill M, Bolk S, Ireland J, Sabeti PC, Richter DJ, Lavery T, Kouyoumjian R, Farhadian SF, Ward R, Lander ES. 2001 Linkage disequilibrium in the human genome. *Nature* 411 (6834): 199–204.
- Solé X, Guinó E, Valls J, Iñiesta R, Moreno V.(2006) SNPStats: a web tool for the analysis of association studies. *Bioinformatics* 22:1928-9

- Tenmizu D, Endo Y, Noguchi K, Kamimura H. (2004) Identification of the novel canine CYP1A2 1117C>T SNP causing protein deletion. *Xenobiotica* 34: 835-846
- Tenmizu D, Noguchi K, Kamimura H. (2006) Elucidation of the Effects of the CYP1A2 Deficiency Polymorphism in the Metabolism of 4-Cyclohexyl-1-ethyl-7-methylpyrido[2,3-d]pyrimidine-2-(1*H*)-one (YM-64227), a Phosphodiesterase Type 4 Inhibitor, and Its Metabolites in Dogs. *DMD* 34:1811–1816
- Tomiyasu H, Goto-Koshino Y, Fujino Y, Ohno K, Tsujimoto H. (2014) Epigenetic regulation of the ABCB1 gene in drug-sensitive and drug-resistant lymphoid tumour cell lines obtained from canine patients. *The Veterinary Journal* 199: 103-109
- Tomiyasu H, Watanabe M, Sugita K, Goto-Koshino Y, Fujino Y, Ohno K, Sugano S, Tsujimoto H. (2013) Regulations of ABCB1 and ABCG2 expression through MAPK pathways in acute lymphoblastic leukemia cell lines. *Anticancer Res. Dec*;33(12):5317-23.
- Trepanier L. (2006) Cytochrome P450 and its Role in Veterinary Drug Interactions. *Vet. Clin. Small Anim.* 36: 975-985
- Wenker A. (2009). Genetic variation in the coding regions of the canine CYP2B11 gene - Implications for Veterinary Medicine? Tesis Doctoral. Facultad de Veterinaria. Universidad de Utrech. (Holanda).
- Whiterock V, Delmonte T, Hui L, Orcutt T, Sinz M. (2007) Frequency of CYP1A2 Polymorphism in Beagle Dogs. *Drug Metabolism Letters* 1: 163-165
- Wu Q, Yang Z, Nie Y, Shi Y, Fan D. (2014) Multi-drug resistance in cancer chemotherapeutics: Mechanisms and lab approaches *Cancer Letters* 347: 159–166
- Zhang Y-J. (2010) Interactions of chemical carcinogens and genetic variation in hepatocellular carcinoma. *WJH* 2: 94-102
- <http://bioinfo.iconcologia.net/SNPstats>
- <http://cmpq.unibe.ch/software/arlequin35/>
- <http://kimura.univ-montp2.fr/genetix/>

- <http://www.ensembl.org/index.html>
- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/mapview/>
- www.fci.be

Direcciones de imágenes

- www.mundoperros.es

DISCUSIÓN GENERAL

En esta Tesis se estudiaron cuatro genes asociados a la respuesta de la especie canina a los tratamientos farmacológicos realizados en la Clínica Veterinaria. Uno de ellos, *MDR1*, pertenece a la superfamilia ABC de proteínas transportadoras de membrana. Tres de ellos, *CYP2D15*, *CYP1A2* y *CYP2B11*, pertenecen a la superfamilia del citocromo P450 relacionados con procesos metabólicos. Estos genes, en trabajos previos en esta especie, ya se han visto involucrados en diferentes tipos de respuestas farmacológicas (Bissonette *et al.*, 2008; Mealey, 2006; Trepanier, 2006; Mise *et al.*, 2004; Neff *et al.*, 2004). En este trabajo, se estudió la presencia de diferentes polimorfismos en estos genes:

- En el capítulo 1 se analizó la presencia de la mutación *mdr1-1Δ* del gen *MDR1* en cuatro razas caninas (Ovejero Alemán, Dobermann, Galgo y Border Collie), descartándose su presencia en las muestras de los animales analizados. Esto puede haberse debido, primariamente, a que la mutación mencionada se encuentre en una frecuencia muy baja en las razas estudiadas ó al bajo número de animales que se pudo analizar en alguna de las razas. Los resultados de este capítulo se presentan en el trabajo **“Análisis de la mutación *mdr1-1Δ* del gen *mdr1* en cuatro razas caninas en Uruguay”** que fue aceptado en la revista MVZ Córdoba.
- El capítulo 2 hace referencia a variaciones en la secuencia de los exones 6 y 7 del gen *CYP2D15*, existentes entre diferentes caninos de la raza Cimarrón Uruguayo. Principalmente se trata de mutaciones puntuales aunque también se discute, en el caso del exón 6, la presencia de diferencias en la secuencia entre dos de las muestras estudiadas respecto de los demás animales. En referencia al exón 7, se discute la presencia de diferentes SNPs. Resultados de este capítulo se comunican en el trabajo: Gagliardi R, Llambí S, Arruga MV. (2011) **Estudio molecular del gen *CYP2D15* (citocromo P450 2D15) en el perro Cimarrón Uruguayo.** AICA Vol. 1: 313-315.
- En lo que respecta al capítulo 3, se estudiaron 26 SNPs existentes en tres genes: *MDR1*, *CYP1A2* y *CYP2B11*. Se compararon entre cuatro razas caninas (Ovejero Alemán, Labrador Retriever, Collie y Cimarrón Uruguayo), encontrándose diferencias respecto de las frecuencias de estos SNPs y cuáles se encuentran fijados en cada una de las razas mencionadas. Por otra parte se realizaron análisis de distancias genéticas, encontrándose que el Cimarrón Uruguayo es el que presenta una distancia mayor con respecto a las otras

razas. También se discute la posible asociación de los SNPs analizados con diferencias en las respuestas farmacológicas, habiéndose encontrado que 15 de ellos son candidatos a estudiarse como asociados a las diferencias mencionadas. Parte de los resultados obtenidos en este capítulo se presentan en el trabajo: Gagliardi R, Llambí S, Arruga MV. (2014) **Estudio de mutaciones puntuales en el gen de resistencia múltiple a drogas en caninos de Uruguay**. AICA Vol. 4: 132-134. Los trabajos “**SNP genetic polymorphisms of MDR- 1, CYP2B11 and CYP2D15 genes in four canine breeds to study possible influence on toxicological evaluations**” y “**Study of different genetic markers (SNPs) in three genes (ABCB1A, CYP1A2 and CYP2B11) related to drug resistance behaviour in canine populations**” que están siendo evaluados en este momento, presentan otros resultados de este capítulo.

Los trabajos que ya han sido publicados se adjuntan a la Tesis.

Los estudios en farmacogenética, ya llevan un tiempo en Medicina humana. No se ha dado la misma situación en Medicina Veterinaria. Los primeros estudios realizados han estado relacionados al gen *MDR1* por su papel en diversos aspectos de suma importancia en la clínica, como ser en determinados tratamientos antitumorales (Tomiyasu *et al.*, 2014; Wu *et al.*, 2014) y antiparasitarios (Geyer *et al.*, 2005; Neff *et al.*, 2004; Mealey *et al.*, 2001). Más tardíamente se ha comenzado a estudiar la familia del citocromo P450 de metabolismo fase 1 (Nishimuta *et al.*, 2013). La información respecto de otras enzimas metabólicas es escasa así como sobre otro de los puntos importantes como son las proteínas blanco donde los fármacos cumplen su función. En nuestro país, existen pocos estudios asociados a la Farmacogenética, particularmente en especies de animales domésticos. Particularmente, en caninos, se comenzaron a realizar estudios vinculados a esta línea en el perro Cimarrón Uruguayo en el Área Genética de Facultad de Veterinaria. Teniendo en consideración únicamente aspectos que involucran a la Clínica Veterinaria, estos estudios permitirían ir llegando al objetivo planteado ya en humanos, lograr una terapia individualizada al paciente que corresponda. Los beneficios de llegar a este fin redundan en un tratamiento más adecuado para el paciente y, lo que no es poco importante, un descenso en los costos para el propietario e incluso para la Clínica Veterinaria.

Si, por otra parte, se considera la importancia que cada especie de animal doméstico presenta para el humano, interesa incrementar la cantidad de estudios relacionados a las respuestas farmacológicas. Si se toman en cuenta los animales de compañía, como en este caso los caninos, presentan importancia desde el punto de vista clínico

y, para el propietario, afectivo. A esto se suma un punto sumamente importante: son una de las especies, no roedor, que más se emplea como modelo animal para extrapolar lo que sucede en el humano (Nishimuta *et al.*, 2013; Fleischer *et al.*, 2008; Bogaards *et al.*, 2000). Si se consideran las especies de producción, los genes asociados a metabolismo y transporte de drogas representan un factor muy importante en lo que respecta a los tiempos de espera en el consumo de los subproductos de origen animal

(http://aesan.msssi.gob.es/AESAN/web/cadena_alimentaria/subseccion/residuos_medicamentos_veterinarios.shtml).

En resumen, tomando en cuenta los distintos factores mencionados, esta Tesis brinda información de lo que sucede a nivel molecular en el análisis de secuencias de genes de transporte y metabolismo de fármacos en siete razas caninas en nuestro país. Estos datos están siendo difundidos por medio de artículos publicados en revistas arbitradas, que se anexan al capítulo correspondiente. También se han comunicado en el libro “Conociendo al Cimarrón Uruguayo” y en otros medios de difusión general. Finalmente, sumado a lo que se menciona en “Perspectivas”, en este momento se están coordinando diferentes instancias para seguir haciendo llegar los resultados a sus usuarios finales: criadores, Médicos Veterinarios, propietarios de mascotas, etc.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS (DISCUSIÓN GENERAL)

- Bissonnette S, Paradis M, Daneau I, Silversides D. (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. *Veterinary Dermatology* 18: 60-66
- Bogaards J, Bertrand M, Jackson P, Oudshoorn M, Weavers R, van Bladeren P, Walther B. (2000) Determining the best animal model for human cytochrome P450 activities: a comparison of mouse, rat, rabbit, dog, micropig, monkey and man. *Xenobiotica* 30: 1131-1152
- Fleischer S, Sharkey M, Mealey K, Ostrander E, Martinez M. (2008) Pharmacogenetic and Metabolic Differences Between Dog Breeds: Their Impact on Canine Medicine and the Use of the Dog as a Preclinical Animal Model. *The AAPS Journal* 10: 110-119
- Geyer J, Döring B, Godoy J, 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
- Mealey K, Bentjen S, Gay J, Cantor G. (2001) Ivermectin sensitivity in collies is associated with a deletion mutation of the *mdr1* gene. *Pharmacogenetics* 11: 727-733
- Mealey K. (2006) Pharmacogenetics. *Vet. Clin. Small Anim.* 36: 961-973
- Mise M, Hashizume T, Matsumoto S, Terauchi Y, Fujii T. (2004) Identification of non-functional allelic variant of *CYP1A2* in dogs. *Pharmacogenetics* 14: 769-773
- Neff M, Robertson K, Wong A, Safra N, Broman K, Slatkin M, Mealey K, Pedersen N. (2004) Breed distribution and history of canine *mdr1-1Δ*, a pharmacogenetic mutation that marks the emergence of breeds from the collie lineage. *PNAS* 101: 11725-11730
- Nishimuta H, Nakagawa T, Nomura N, Yabuki M. (2013) Species differences in hepatic and intestinal metabolic activities for 43 human cytochrome P450 substrates between humans and rats or dogs. *Xenobiotica, Early Online*: 1-8

- Tomiyasu H, Goto-Koshino Y, Fujino Y, Ohno K, Tsujimoto H. (2014) Epigenetic regulation of the ABCB1 gene in drug-sensitive and drug-resistant lymphoid tumour cell lines obtained from canine patients. *The Veterinary Journal* 199: 103-109
- Trepanier L. (2006) Cytochrome P450 and its Role in Veterinary Drug Interactions. *Vet. Clin. Small Anim.* 36: 975-985
- Wu Q, Yang Z, Nie Y, Shi Y, Fan. (2014) D.Multi-drug resistance in cancer chemotherapeutics: Mechanisms and lab approaches *Cancer Letters* 347: 159–166
- http://aesan.msssi.gob.es/AESAN/web/cadena_alimentaria/subseccion/residuos_medicamentos_veterinarios.shtml: Consultada en Julio, de 2014.

Las imágenes donde no figura dirección URL son propias.

CONCLUSIONES

Del trabajo realizado en esta Tesis pueden sacarse una serie de conclusiones:

- Exceptuando el banco de ADN de perros cimarrones, ya existente en el laboratorio, se conformaron bancos de ADN de seis razas caninas.
- Capítulo 1: en principio, la mutación *mdr1-1Δ* del gen *MDR1* no se encuentra en ninguna de las cuatro razas analizadas (Ovejero Alemán, Dobermann, Galgo y Border Collie).
- Capítulo 2: tanto para el exón 6 como para el exón 7 del gen *CYP2D15*, existen polimorfismos entre los distintos caninos de raza Cimarrón Uruguayo.
- Capítulo 3:
 - Existen diferencias respecto de los SNPs que están fijados en las cuatro razas estudiadas (Ovejero Alemán, Labrador Retriever, Collie, Cimarrón Uruguayo).
 - Dados los valores de *F_{is}* negativos presentados por las muestras de las cuatro razas estudiadas, se estaría descartando endocria en los animales estudiados.
 - La raza Cimarrón Uruguayo presenta una distancia genética mayor respecto de las demás razas estudiadas.
 - Los haplotipos más frecuentes difieren entre las cuatro razas.
 - De los 26 SNPs estudiados, 15 de ellos pueden ser indicativos de sensibilidad a drogas. Uno perteneciente al gen *MDR1*, uno al *CYP2B11*, y los demás pertenecientes al gen *CYP1A2*.

El aporte de la presente Tesis se da en diferentes aspectos:

- Razas estudiadas: La raza que se emplea rutinariamente en estudios de esta clase suele ser la raza Beagle. En esta Tesis se trabajó con otras siete razas caninas.
- Una de las razas estudiadas, el Cimarrón Uruguayo, es la única raza canina autóctona de nuestro país, por lo que el trabajo realizado continúa promoviendo y aportando datos sobre estudios en la misma.
- En el caso de la raza Dobermann, donde se han descrito reacciones adversas al antiparasitario ivermectina, es uno de los trabajos donde se estudian mayor cantidad de animales.

- Se estudiaron genes que además de estar involucrados en diferentes respuestas farmacológicas, se han visto asociados a diferentes patologías.
- En particular, en el tercer capítulo, se obtiene información sobre el posible estudio de 26 SNPs como candidatos a analizar en asociaciones con diferencias en la respuesta a fármacos.
- Los resultados obtenidos se están comunicando por diferentes vías (simposios, revistas arbitradas, etc) de forma que lleguen a distintos actores: Clínica Veterinaria, criadores de diferentes razas caninas, propietarios de animales, etc, a quienes interesan los mismos.

PERSPECTIVAS

En los aspectos concretos que refieren a los trabajos relacionados a genes asociados a respuestas a terapias farmacológicas, se pretende continuar con el estudio de los mismos de diferentes maneras:

- Continuar con el estudio de diferentes genes relacionados a las respuestas farmacológicas.
- Incrementar el número de animales estudiado por raza y el número de razas estudiadas.
- En el caso del gen *CYP2D15*, analizar si las diferencias encontradas pueden tener efecto sobre la proteína formada.
- Estudiar animales que ya hayan presentado respuestas adversas a tratamientos farmacológicos (estudios de asociación fenotipo/genotipo).
- Profundizar en el estudio de lo que pasa en especies de interés veterinario respecto a los tratamientos antitumorales.
- Realizar estudios en conjunto con el Hospital Veterinario y con Clínicas particulares.
- Trabajar en conjunto con criadores de diferentes razas en los aspectos de respuestas farmacológicas que correspondan a cada una de ellas.
- Difundir los resultados de los diferentes estudios entre interesados en la temática (Médicos Veterinarios, criadores de las diferentes razas, propietarios de mascotas, estudiantes).

Además del último punto de difusión mencionado, se debe considerar que esta Tesis está afianzando una línea que se ha ido desarrollando en los últimos años en el Área Genética de la Facultad de Veterinaria. Esto brinda la posibilidad de que se sigan realizando estudios en el marco de la misma, de diferentes formas, entre las que se consideran tesis de grado y postgrado. Desde otro punto de vista, el trabajar con el Hospital de Facultad de Veterinaria y con Clínicas particulares estaría dando la posibilidad de que los resultados que se obtengan lleguen, en última instancia, hasta los usuarios finales de esta información: Propietarios de mascotas, criadores, etc.