

UNIVERSIDAD DE LA REPUBLICA

FACULTAD DE VETERINARIA

ANALISIS DE LA MUTACION DEL GEN *MDR1* (gen de resistencia múltiple a drogas) EN LAS RAZAS GALGO Y BORDER COLLIE EN URUGUAY

“por”

Pedro SITJAR QUIJANO

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

MODALIDAD: Trabajo de investigación

MONTEVIDEO

URUGUAY

2013

TRABAJO FINAL aprobado por:

Presidente de Mesa:

Nombre completo y Firma

Segundo Miembro (Tutor):

Nombre completo y Firma

Tercer Miembro:

Nombre completo y Firma

Co tutor:

Nombre completo y Firma

Fecha:

Autor:

Nombre completo y Firma

Agradecimientos:

Quiero agradecer muy especialmente a mi tutora Rosa Gagliardi y mi co-tutora Silvia Llambi quienes colaboraron ampliamente en este trabajo como guías, tuvieron la paciencia necesaria para poder llevar esto adelante. También un reconocimiento al departamento de genética y todos sus integrantes que colaboraron durante lo que duro este proyecto. No puedo olvidarme de todos aquellos propietarios de animales que donaron las muestras que fueron evaluadas en el presente trabajo, a los que no me atrevo nombrar por temor a olvidarme de algunos, ya que en total debemos haber extraído muchas más muestras de las requeridas. Ni que hablar a la facultad de veterinaria la cual me brindo la posibilidad de ampliar mis conocimientos no solo en el área de genética sino también en materia general.

TABLA DE CONTENIDO

	Página
PÁGINA DE APROBACIÓN.....	1
AGRADECIMIENTOS.....	2
LISTA DE CUADROS Y FIGURAS.....	5
1. RESUMEN.....	6
2. SUMMARY.....	7
3. INTRODUCCION.....	8
4. ANTECEDENTES Y FUNDAMENTO.....	11
4.1. LA SUBFAMILIA MDR.....	11
4.2. EL GEN MDR1.....	11
4.3. EL GEN MDR1 Y LA IVERMECTINA.....	12
4.4. LA GLUCOPROTEÍNA P (Gp-P)	13
4.5 LA GLUCOPROTEÍNA P EN OTRAS ESPECIES DE REFERENCIA.....	15
4.6. NEOPLASIAS Y SUS TRATAMIENTOS.....	16
4.7. RESISTENCIA ANTIHELMINTICA.....	16
4.8. LA RAZA COLLIE Y OTROS CANINOS.....	17
4.9. LOS COLLIE Y RAZAS EMPARENTADAS	17
4.10. EL BORDER COLLIE.....	18
4.11. EL GALGO.....	19
4.12. FARMACOS QUE NO DEBEN EMPLEARSE EN PRESENCIA DE LA MUTACIÓN.....	19

5.OBJETIVOS.....	23
5.1. GENERALES.....	23
5.2. ESPECIFICOS.....	23
6. ESPECIFICACIONES DE LAS PREGUNTAS QUE BUSCA RESPONDER EL TRABAJO.....	24
7. MATERIALES Y METODOS.....	25
7.1. TOMA Y CONSERVACION DE MUESTRAS.....	25
7.2. PROCEDIMIENTOS DE EXTRACCION DE ADN.....	26
7.3. ANALISIS DE LAS MUESTRAS OBTENIDAS.....	33
8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	34
CONCLUSIONES.....	42
PERSPECTIVAS FUTURAS.....	43
BIBLIOGRAFIA.....	44
ANEXOS	
ANEXO 1 FOTOGRAFIA BORDER COLLIE.....	47
ANEXO 2 FOTOGRAFIA GALGO.....	47

LISTA DE CUADROS Y FIGURAS

FIGURA 1 ESTRUCTURA DEL GEN MDR1.....	13
FIGURA 2 ESTRUCTURA DE LA GP-P.....	14
TABLA 1 EXTRACCION DE ADN BORDER COLLIE.....	34
TABLA 2 EXTRACCION DE ADN GALGO.....	36
TABLA 3 SECUENCIACION DEL ADN.....	38

RESUMEN

En la década de 1980 comenzaron a utilizarse ampliamente las lactonas macrocíclicas en Medicina Veterinaria como endectocidas (antiparasitarios eficaces contra endo y ectoparásitos). Esto trajo como consecuencia que muchos caninos, especialmente de la raza Collie, presentaran cuadros de intoxicación. Posteriormente se supo que dichos cuadros se producían a consecuencia de una pérdida de cuatro pares de bases a nivel de su ADN, más específicamente en el gen *MDR1* (mutación *mdr1-1Δ*). Este gen codifica una proteína perteneciente a la familia de las ATP binding cassette (familia ABC), proteínas que cumplen una función de barrera protectora en las membranas celulares de diversos tejidos. La finalidad de este trabajo fue profundizar en los conocimientos a nivel molecular sobre la región del gen *MDR1*, donde se encuentra la mutación mencionada en caninos. Se analizaron muestras de dos razas no emparentadas: Border Collie (n= 25) y Galgo (n= 25) en Uruguay. Se extrajo ADN a partir de muestras de sangre . Se utilizaron dos técnicas de extracción de ADN (técnica con NaCl en el caso de las muestras de perros Border Collie y técnica de extracción con acetato de potasio para la raza Galgo). Una vez obtenidos los ADN se enviaron a genotipar a laboratorio privado a GeneSeek. Del análisis del genotipado se concluye que en las muestras estudiadas no se identificó la presencia de la mutación *mdr1-1Δ*

SUMMARY

Macrocyclic lactones are widely used as endectocides (effective antiparasitics against endo and ectoparasites) in Veterinary Medicine since the 1980s. As a consequence many dogs especially Collies showed intoxication. It was discovered afterwards that the four base pairs loss at their DNA level, more specifically in the MDR1 gene ($mdr1-1\Delta$ mutation) were responsible for these cases. This gene encodes a protein belonging to the ATP binding cassette family (ABC family), proteins playing the role of protective barrier in the cell membranes of various tissues. The purpose of this study was to deepen the knowledge at the molecular level of the MDR1 gene region, where this mutation is found in Uruguay canines. We studied samples of two unrelated breeds: Border Collie ($n = 25$) and Greyhound ($n = 25$). DNA was extracted from blood samples. Two techniques were used for DNA extraction (NaCl technique for Border Collie dogs and potassium acetate for Greyhounds). We sent the DNA for genotyping to a private laboratory GeneSeek. From the Genotyping analysis we concluded that: a) in the samples studied the $mdr1-1\Delta$ mutation was not identified and b) the potassium acetate DNA extraction technique was the best for this type of study..

INTRODUCCIÓN

El gen *MDR1* (gen de resistencia múltiple a drogas) se encuentra ampliamente distribuido en diferentes organismos habiendo sido descrito tanto en procariontes como eucariotes. Este gen codifica para una proteína de membrana, denominada glucoproteína-P, la que presenta una estructura que se asemeja a la de la superfamilia de proteínas transportadoras tipo ABC (ATP binding cassette) (Juliano y Ling, 1976). Diversos autores han comunicado que la función de esta proteína consiste en eliminar distintos tipos de sustancias (entre ellas algunas drogas ampliamente utilizadas en Medicina Veterinaria) del espacio intracelular impidiendo que las mismas alcancen niveles tóxicos en diferentes tejidos corporales como ser tejido digestivo, renal, hepático, sistema nervioso central (Dean et al., 2001; Vulevic et al., 2001).

A comienzos de los años 80 se comenzaron a utilizar las lactonas macrocíclicas como fármacos endectocidas en caninos. La droga más empleada dentro de esta familia, siendo aún muy utilizada, fue la ivermectina. La particularidad de estos fármacos (como lo indica su nombre) es que tienen un gran espectro de actividad, siendo eficaces tanto contra endo como contra ectoparásitos. Sumado a esto, se debe unir el hecho de que en la gran mayoría de las especies de animales domésticos, entre los que se incluyen también la mayoría de las razas caninas, esta droga presenta un amplio margen de seguridad. Las dosis empleadas para alcanzar un efecto terapéutico es entre 200 y 300 µg/kg (dependiendo de la especie animal) mientras que las dosis tóxicas son del orden de los mg/kg (Marques-Santos et al., 1999).

Desde el momento en que se comenzó a usar ivermectina en caninos comenzó a registrarse la muerte de algunos de ellos tras la aplicación, particularmente en animales de raza Collie. Estudios previos realizados en ratones *knock-out* para el gen *MDR1*, que morían tras la aplicación de ivermectina, llevaron a relacionar la sensibilidad de los caninos a las lactonas macrocíclicas, con algún tipo de alteración a nivel genético en el gen *MDR1*.

En el caso de caninos, de manera independiente dos grupos de investigadores identificaron una pérdida de cuatro pares de bases (delección) en el exón 4 (nt230 (del4)) del gen *MDR1* en animales sensibles a la ivermectina, sobre todo en la raza

Collie (Mealey *et al.*, 2001; Roulet *et al.*, 2003). Estos autores también observaron que el homocigota para la mutación (dos copias del alelo mutado) era sensible a la ivermectina, no detectándose esto en el heterocigoto (una sola copia del alelo mutado) ni en el homocigota salvaje, determinándose un modelo de herencia autosómica recesiva (Mealey *et al.*, 2001; Roulet *et al.*, 2003).

Estudios posteriores, demostraron que la delección en el gen no solo se encontraba en el linaje Collie, sino también en otras razas que no compartían ascendencia con ellos, como ser los lebreles (Neff MW *et al.*, 2004). También se ha ido aumentando la lista de fármacos tóxicos y potencialmente tóxicos que serían sustrato de la glucoproteína-P y por tanto nocivos para animales que presentasen la mutación (Mealey *et al.*, 2001)

Por otra parte, este gen ha sido el blanco de diferentes estudios con el fin de ver si se encuentra relacionado a diferencias en el efecto de tratamientos realizados en la clínica veterinaria así como en la humana. Por un lado, estudios realizados en parásitos, han demostrado que el gen *MDR1*, también presente en estos individuos, participaría de manera activa en la resistencia antihelmíntica a distintos fármacos antiparasitarios. A otro nivel, en el caso de terapias antitumorales, se han hecho gran número de estudios acerca de la implicancia que tendría este gen en los fracasos de la quimioterapia, habiéndose comunicado en algunos casos una sobre expresión del mismo en determinados tumores. En humanos si bien no se ha detectado ninguna delección en *MDR1*, se han relacionado ciertas mutaciones puntuales (SNPs, polimorfismo de nucleótido simple) con la aparición de distinto tipo de enfermedades (leiri *et al.*, 2004; Geyer *et al.*, 2005)

En el Uruguay se ha investigado esta mutación particularmente en la raza cimarrón donde, no se detectó la mutación en los animales analizados, los únicos animales de este trabajo que presentaron la mutación fueron los collie. Los resultados obtenidos fueron los esperados, ya que los cimarrones descienden de perros españoles no emparentados con canes, los cuales si poseen la mutación (Gagliardi,R., 2009).

El objetivo de este trabajo es evaluar la presencia de la delección del gen *MDR1* (*mdr1-1Δ*) en una muestra poblacional de dos razas caninas no emparentadas, con gran presencia en nuestro país: Border Collie (perteneciente a la familia de los Collie, perros pastores) y Galgo (perteneciente al grupo de lebreles).

Análisis de la mutación del gen *MDR1* (gen de resistencia múltiple a drogas) en las razas Galgo y Border Collie de Uruguay

4. Antecedentes y fundamentación

4.1. La subfamilia *MDR*

El gen *MDR1* pertenece a una subfamilia de genes que presentan tres isoformas: MDR I, II y III, las clases I y II codifican proteínas transportadoras confiriendo resistencia a múltiples drogas, la clase III sin embargo, no está asociada al transporte de fármacos puesto que codifica para una translocasa de la fosfatidilcolina localizada en la membrana de los canalículos biliares (Smith JJ *et al.*, 1993).

4.2. El gen *MDR1*

El gen *MDR1* (gen de resistencia múltiple a drogas) codifica para una proteína que tiene como función el transporte de distintas sustancias (entre ellas diversos fármacos) desde los órganos corporales hacia la sangre para posteriormente ser eliminadas. Esta proteína denominada glucoproteína-P (gp-P), fue descubierta en 1976 por Juliano y Ling en células de ovario de hámster chino, que fueron seleccionadas por su resistencia a la colchicina (Marzolini *et al.*, 2004; Mealey *et al.*, 2004).

En caninos, el gen *MDR1* está localizado en el cromosoma 14 y está compuesto por 28 exones (segmentos codificantes). En esta especie, de manera independiente dos grupos de investigadores han identificado una delección de 4 pb en este gen *MDR1* (Mealey *et al.*, 2001; Roulet *et al.*, 2003). Esta mutación se describió en caninos de raza Collie que presentaban sensibilidad a la ivermectina. Esta mutación causa que la gp-P sea no funcional ya que se presenta en un 10 % de lo normal, haciendo que la gp-P pierda su función normal. Esto se debe a que la mutación *mdr1-1Δ* [nt230 (nucleótido 230) (del4)] que está localizada en el exón 4, causa un cambio a partir del aminoácido 75 seguido por un codón de parada prematuro en el aminoácido 91,

que vuelve trunca a la gp-P (Roulet *et al.*, 2003). Esta pérdida de función hace que los caninos sean susceptibles de sufrir una reacción potencialmente fatal a una gama de medicamentos comúnmente utilizados en Medicina Veterinaria (antiparasitarios, antieméticos, tranquilizantes, etc.) (Peláez de Lucas, 2011).

También se vio que todos los perros homocigotos para la mutación *mdr1-1Δ* (dos copias del alelo mutado) presentan un fenotipo sensible para la ivermectina no detectándose este problema en heterocigotos para la mutación (una copia del alelo mutado) ni tampoco en el homocigoto salvaje, determinándose un modo de herencia autosómico recesivo (Mealey *et al.*, 2001) En los casos de perros homocigotos para la mutación, la pérdida de función de la gp-P es completa, por lo tanto los medicamentos cuya distribución en el organismo dependan de la misma, tendrán acceso a órganos en los cuales no deberían estar, ocasionando un efecto tóxico. En los perros heterocigotas para la mutación del gen *MDR1* sí habrá proteína, pero no en cantidades necesarias para su normal funcionamiento; también se sabe que hay moléculas que pueden disminuir (ej. ivermectina) o aumentar (ej. dexametasona) la actividad de la proteína (Peláez de Lucas, 2011; Mealey *et al.*, 2001).

4.3. El gen *MDR1* y la ivermectina

En la década de 1980 comienza a utilizarse la ivermectina como antiparasitario en diversas especies de animales domésticos. Esta droga tiene un amplio margen de seguridad en rumiantes, cerdos, equinos y la mayoría de las razas caninas, este margen es al menos diez veces la dosis terapéutica (0,006 -0,5 mg/kg) (Mckellar *et al.*, 1996; Burkhart *et al.*, 2000). Pese a esto, se observaron intoxicaciones agudas en ratones y ratas tras la administración del fármaco. Los signos que presentaron estos individuos consistieron en ataxia, temblores, actividad reducida y muerte uno a dos días después de dicha administración. Esto fue observado particularmente en animales jóvenes de 1 y 2 días de vida y fue atribuido al escaso desarrollo de la barrera hematoencefálica, lo que permitiría el acceso del compuesto al SNC (Marques-Santos *et al.*, 1999, Dodarkar SS *et al.*, 2007). Distintos estudios realizados en estas especies a nivel molecular, pusieron en evidencia que animales portadores de una mutación en el gen *MDR1*, morían tras la administración de

ivermectina ya sea de forma oral o intraperitoneal. Esto llevó a que se estableciera una relación entre sensibilidad a la droga y presencia de la mutación.

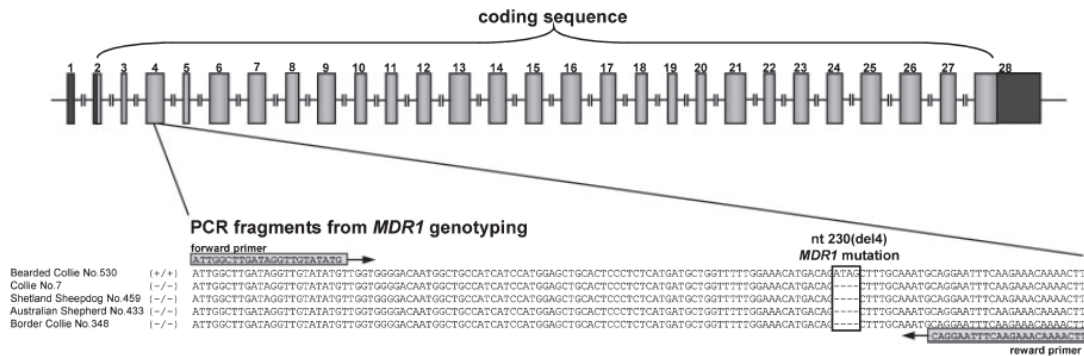


Figura 1: Esquema del gen MDR1 señalando la región de la mutación (extraído de Geyer J. *et al.*, 2005).

Paralelamente al uso de la ivermectina, en los caninos comienzan a producirse muertes luego de su administración. En las necropsias de estos individuos se detecta una elevada presencia de este fármaco a nivel del SNC existiendo una alta prevalencia de casos en la raza Collie (Schinkel *et al.*, 1994). Los estudios previos realizados en roedores llevaron a asociar estas muertes con cambios en el gen *MDR1*. Distintos factores han llevado a que el estudio del efecto de la droga en estos animales haya presentado un gran interés. Entre estos se encuentra el hecho del gran margen de seguridad que presenta la droga en otros animales, así como el interés de la misma como endectocida (eficaz contra endo y ectoparásitos). Por otra parte también hay que considerar que existen un gran número de fármacos, además de la ivermectina, ampliamente usados en Medicina Veterinaria que interactúan con la gp-P (Shinkel *et al.*, 1995; Mealey *et al.*, 2001).

4.4. La glucoproteína-P (gp-P)

La gp-P es una glucoproteína de membrana de 170 kDa., responsable de una disminución en los niveles de distintas sustancias en el interior de las células, mediante un mecanismo de transporte dependiente de ATP (de ahí proviene el nombre de glucoproteína-P porque está directamente implicada en la permeabilidad celular) (Fig. 2). Su estructura se asemeja a la de la superfamilia de proteínas transportadoras tipo ABC (de ATP binding cassette) que cuenta con más de cuarenta miembros comprobándose su presencia tanto en procariontes (bacterias)

como en eucariotas (Juliano y Ling, 1976). En todos los casos, el producto es una proteína que tiene la función de transportar moléculas y la protección frente a compuestos xenobióticos (compuestos exógenos al organismo). Se han encontrado genes homólogos en plantas (maíz, arroz, vid, etc.) sin conocer cuál es su función.

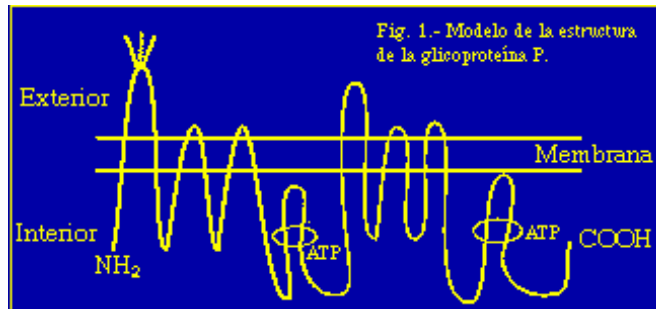


Figura 2: Esquema de la estructura de la glucoproteína-P (extraída de <http://www.encuentros.uma.es/encuentros33/glicoprot33.html>).

La gp-P se expresa en células epiteliales a nivel de la mucosa intestinal, membrana canalicular del hígado, túbulo proximal renal, la barrera hematoencefálica y placenta. Esta proteína se une al ATP y usa la energía para dirigir el transporte de moléculas a través de la membrana celular por lo general hacia fuera de la célula o hacia compartimientos como retículo endoplásmico, mitocondrias y peroxisomas.

Un modelo postulado para el mecanismo de acción de esta proteína es el de "aspirador hidrofóbico" según el cual el fármaco no solo es bombeado hacia fuera de la célula sino que también disminuye su entrada en ésta (Gottesman *et al.*, 1990). Aquellos compuestos que entran por difusión pasiva son detectados nada más entrar en la membrana y expulsados al exterior de modo que no puedan alcanzar la concentración necesaria para ejercer su efecto citotóxico (<http://www.encuentros.uma.es/encuentros33/glicoprot33.html>).

La gp-P es capaz de transportar una amplia variedad de moléculas que presentan una estructura química distinta entre sí. Se ignora como esta proteína puede reconocer tal gama de productos, aunque se sabe que todas estas moléculas tienen

en común el ser hidrófobas, neutras o cargadas positivamente y de peso molecular pequeño (200 y 1800 dalton).

4.5. La glucoproteína-P en otras especies de referencia

En la especie humana, el gen se localiza en el cromosoma 7, consta de 210 Kb y codifica una proteína de 1280 aminoácidos. Se han detectado más de 20 mutaciones en humanos denominadas SNP (single nucleotide polymorphisms: cambios de un solo nucleótido) las cuales se cree que reducirían la función de la gp-P. Pese a esto, hasta el momento no se ha detectado un alelo nulo como se da en los caninos (Ileiri *et al.*, 2004). En particular, no se ha detectado la mutación descrita en el exón 4 de caninos, así como tampoco se han detectado SNPs en dicho exón (Geyer *et al.*, 2005). Sin embargo, sí han sido registrados serios trastornos en personas que siguen un tratamiento con ivermectina para la oncocercariasis. 55% de los casos comunicados fueron en Camerún, tratándose de neurotoxicidad compatible con la intoxicación por ivermectina (Twom- Danso, 2003). También los polimorfismos han sido asociados con ciertas enfermedades en humanos, tales como el Parkinson, la enfermedad inflamatoria intestinal, la epilepsia resistente a múltiples fármacos, el carcinoma renal, la enfermedad de Crohn y la colitis ulcerativa.

En ratones se ha observado la aparición de colitis espontánea a las 12 semanas de vida; estudios realizados, sugieren que la disminución o carencia de la gp-P a nivel de las células intestinales, sería un factor en la patogenia de la enfermedad inflamatoria intestinal. La hipótesis sugiere que la ausencia de gp-P ocasionaría un aumento en el contacto de los tejidos a sustancias xenobioticas potencialmente tóxicas (Ho *et al.*, 2003; Wilk *et al.*, 2005).

4.6. Neoplasias y su tratamiento

En el caso de tumores en humanos, se han comunicado dificultades a la hora de realizar distintos tratamientos. El factor más importante que contribuye al fracaso de estos tratamientos contra el cáncer, es la resistencia de las células tumorales a las drogas empleadas en la quimioterapia. Es una resistencia simultánea a una variedad de agentes citotóxicos que tienen diferentes blancos y distinta estructura química. Esto puede ser una propiedad intrínseca de las células tumorales o podrían ser adquiridos por la población de estas células tumorales que inicialmente fueron sensibles a la quimioterapia, pero se vuelven resistentes después de la exposición a los agentes citotóxicos. La resistencia a los fármacos está dada, entre otros, por el gen *MDR1*, y se atribuye a una mutación o amplificación de genes que codifican para la gp-P (Gottesman *et al.*, 1988; Weinstein *et al.*, 1991). Uno de los muchos tratamientos que se emplean en neoplasias que presentan multiresistencia a drogas, consiste en suministrar de forma combinada fármacos anti- neoplásicos con drogas inhibitoras de la gp-P como ser los bloqueadores de los canales de calcio (verampamilo, nifedipina, nicaldipina), antipalúdicos (quinidina, quinacrina), las fenotiazinas, hormonas (progesterona), la ciclosporina A. El verampamilo es la droga que más se ha utilizado con este fin, con el inconveniente que es cardiotóxica a altas dosis, pero el isómero D, presenta menor toxicidad que el L. Actualmente hay una nueva generación de inhibidores de la Gp-P (D verampamilo, dexniguldina, PSC 830) menos tóxicos, pero aún se encuentran en fase de estudio (Fisher *et al.*, 1996; Berman *et al.*, 1995).

4.7. Resistencia antihelmíntica

En otro nivel, también, se ha asociado a la gp-P con la resistencia antihelmíntica. La primera gp-P en helmintos fue descrita a partir del nematodo de vida libre *Caenorhabditis elegans* (Broeksa y Janssen, 1995), posteriormente fue descrita en *Onchocerca vulvulus* y *Haemonchus contortus* (Kwa *et al.*, 1998). Ha sido demostrado que la transcripción del gen que codifica a la gp-P estaría alterada en nematodos resistentes a fármacos endectocidas. Por otra parte se sabe que el ARNm, responsable de que se produzca gp-P, está presente en mayores cantidades en *Haemonchus contortus* resistente a ivermectina comparado con los susceptibles. Esto indicaría una sobreexpresión de la gp-P en nematodos resistentes, pudiendo

encontrarse a niveles mayores que en otros parásitos (Xu *et al.*, 1998). La coadministración de drogas endectocidas como ivermectina, moxidectina junto con verampamilo incrementaría el porcentaje de eficiencia contra *Haemonchus contortus* resistente a estas drogas en animales de laboratorio (Molento y Pritchard, 1999).

4.8. La raza Collie y otros caninos

La mutación en *MDR1* (*mdr1-1Δ*) ha sido asociada con la sensibilidad a drogas en la raza Collie y razas emparentadas. Sin embargo este mismo alelo *mdr1-1Δ* (mutante) se encontró en siete razas adicionales, incluyendo dos sighthounds (lebreles) que no se espera compartan ascendencia con los Collie. Esto se explicaría por la presencia de un palíndromo que se encuentra a 9 pb del gen *MDR1*. Estas secuencias de imágenes en espejo (GATAG) predisponen a mutaciones. Por esta razón es que alelos idénticos, de razas totalmente distintas, provienen de mutaciones independientes (Neff *et al.*, 2004). Hay autores que consideran que la mutación no se habría dado en razas independientes. Estos consideran que tanto pastores como lebreles, razas en las cuales se ha detectado la mutación, tendrían un antepasado común (Peláez de Lucas, 2012).

4.9. Los Collie y razas emparentadas

Distintos factores permiten concluir que todos los perros del linaje Collie portadores del alelo *mdr1-1Δ* son descendientes de un perro que vivió en las islas británicas antes de que comenzara el aislamiento genético de razas por registro (en 1873) en Inglaterra. Esto se debe a que lo que se presenta es un haplotipo mutante que se conserva entre razas afectadas del linaje collie. Un haplotipo es la constitución alélica de múltiples loci para un mismo cromosoma. Esto indica que el alelo es idéntico por descendencia pudiendo concluir, basados en la historia de las razas y el grado de ligamiento, la existencia del antepasado común mencionado. También se encontró que el alelo mutante (*mdr1-1Δ*) se encuentra en baja frecuencia en ciertas variedades de Collie, como el Border Collie, Collie Barbudo y el Australian Cattle Dog. La sensibilidad a ciertos fármacos (ivermectina entre otros) descrita en estos animales podría ser independiente a la mutación del gen *MDR1* pudiendo estar implicados otros genes (Neff *et al.*, 2004)

La mutación del *mdr1-1Δ* se encuentra en diferentes frecuencias en las distintas razas caninas: entre estas, en Border Collie se encuentra en un porcentaje menor al 5%; mientras que en el grupo de los lebreles, en Silken Windhound se encuentra en un 30 % y en Whippet de pelo largo 65 %. Estas frecuencias fueron observadas en los Estados Unidos (Pelaez de Luca 2011; Neff *et al.*, 2004).

En otros países se ha descrito la presencia de dicha mutación en estas razas (Mealey *et al.*, 2001; Geyer *et al.*, 2005; Kawabata *et al.*, 2005). Pese a esto, en nuestro país no se ha estudiado su presencia y/o prevalencia en estas razas, aunque si se ha estudiado en perros cimarrones y en collies, encontrando únicamente en esta última (Gagliardi, 2009)

4.10. El Border Collie

Proviene de las tierras altas de Escocia, en donde sus precursores fueron introducidos en las islas británicas entre los siglos V a.c y I a.c por las comunidades celtas, las cuales se instalaron primero en Irlanda de donde proviene el nombre collie, que quiere decir "útil" en Gales. Luego esos grupos humanos se fueron trasladando hacia las regiones escocesas, donde surge la raza Highlands Collie que más tarde dará origen a los Border Collie (del inglés; el perro útil de la frontera) en la zona entre Escocia e Inglaterra. En nuestro país esta raza actualmente realiza trabajos de campo, en particular con ovinos, y en la ciudad, se lo puede encontrar como animal de compañía.

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. El cuerpo es ligeramente más largo que la altura medida a la región de la cruz.

Federación Cinológica Internacional (FCI) (<http://www.fci.be/>).

4.11. El Galgo

En el Uruguay contamos con descendientes de galgo ibérico y otras cruizas por el estilo. El galgo español es una raza muy antigua, las primeras referencias escritas del galgo ibérico, se hallan en el tratado del siglo II a.c Cynegeticus, de Arriano de Nicodemia, quien fue cónsul de la Bética (antigua Provincia Romana situada en la península Ibérica). El autor que estuvo en Hispania, describe la caza de liebres con galgos tal y como se hace en la actualidad en España. Hay referencias a los galgos en textos como en la primera frase de El Quijote: “en un lugar de la mancha, de cuyo nombre no quiero acordarme, no hace mucho tiempo que vivía un hidalgo de los de lanza en astillero, adarga antigua, rocín flaco y galgo corredor”. A principios del siglo XX hubo un mestizaje del galgo español y el greyhound o lebel inglés. Esto fue 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 también se emplea en la caza, particularmente de liebres, y como animal de compañía.

De construcción 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. La flexibilidad de las extremidades hace resaltar su tipo distintivo y sus cualidades de elegancia. Datos obtenidos de la Federación Cinológica Internacional (FCI) (<http://www.fci.be/>).

4.12. Fármacos que no deben emplearse en animales que presentan la mutación

Como se mencionó previamente, existen gran número de fármacos que interactúan con la gp-P. Con algunos de ellos se sabe que pueden presentarse problemas mientras que no se conoce el efecto de otros (Mealey *et al.*, 2006). Entre estos fármacos encontramos:

- Antiparasitarios del grupo de las avermectinas: **ivermectina**, **doramectina** y **abamectina**. Estos antiparasitarios pueden producir la muerte por neurotoxicidad en perros que sean homocigotos para la mutación *mdr1-1Δ*

con una única dosis, y con dosis diarias para el tratamiento de *Demódex* spp. en perros portadores del alelo mutante.

- Otros agentes antiparasitarios: el **emodepside** (Profender®) se sabe que es sustrato de la gp-P y a una dosis del doble de lo recomendado ya es tóxico. Su toxicidad aumenta si el perro no estaba en ayunas. Se recomienda no usar en homocigoto ni heterocigoto. Hay reportes del **levamisol** como muy tóxico (otro agente antiparasitario que actualmente se usa también como estimulante de la inmunidad celular).
- Antidiarreicos: la **loperamida**, a la dosis recomendada ya produce sintomatología neurológica en perros portadores de la mutación.
- **Metoclopramida**: agente antiemético y gastrocinético, resulta tóxico en perros homocigotos para la mutación.
- Drogas potencialmente peligrosas: otras avermectinas sintéticas como **milbemicina**, **moxidectina** y **selamectina**, podrían no ser tan peligrosas como las naturales pero igual acarrear riesgos.
- Agentes preanestésicos: otras moléculas peligrosas tanto para perros homocigotos como heterocigotos, son la **acepromacina** y el **butorfanol**, ambos producen cuadros de sedación más profunda y prolongada en animales con la mutación. Se recomienda reducir la dosis entre un 30-50 x 100 en estos animales.
- Agentes antitumorales y quimioterápicos: **vincristina**, **vinblastina** y **doxorubicina**. En perros portadores de la mutación, se ha descrito un descenso de células sanguíneas, anorexia, vómitos y diarrea a dosis normales. En función a esto, se recomienda reducir la dosis.

(Peláez de Luca, 2011; Mealey *et al.*, 2001)

Existen otros medicamentos de los cuales no se dispone de suficiente información pero que se consideran potencialmente tóxicos. Entre ellos se encuentran:

- Antibióticos: **eritromicina**, **rafloxacina**, **esparfloxacina**, **rifampicina**.
- Antifúngicos: **ketoconazol** o **itraconazol**.

- Drogas cardíacas: **digoxina, digitoxina, quinedina, diltiazem, verapamil** (bloqueador de los canales de calcio).
- Fármacos utilizados en gastroenterología: **cimetidina, ranitidina, domperidona y ondansetrona.**
- Otros fármacos:
- **Dexametasona:** corticoide sintético muy empleado en Clínica Veterinaria.
- **Fenitoína:** antiepiléptico.
- **Estradiol:** hormonal.
- Hay medicamentos que parecen no tener efectos tóxicos en perros portadores, pero se sabe que son sustrato de la gp-P por lo que se recomienda tener cuidado. Tal es el caso de: **ciclosporina** (agente inmunosupresor), **doxiciclina** (antibiótico), **morfina, buprenorfina, fentanil** (analgésicos opioides o medicamentos contra el dolor).
- Sumado a lo anterior, también tenemos sustancias **inhibidoras de la gp-P:** son moléculas que reducen la acción de la glicoproteína-P ocasionando que la eliminación de fármacos sea mucho más lenta. Obviamente perros homocigotos para la mutación carecen de gp-P, pero los portadores la presentan en menor cantidad por lo tanto un inhibidor podría anular casi totalmente su actividad. Dentro de estas sustancias tenemos: **ivermectina y loperamida**, por eso su alta toxicidad en animales homo y heterocigotos. También hay sustancias naturales que pueden inhibir la gp-P (naranja, pomelo y uva) ya que contienen **quercetina** (sustancia inhibidora de esta proteína), el **verapamil**, la **ciclosporina**, son sustancias utilizadas para inhibir la acción de la gp-P en los tratamientos empleados contra el cáncer.

Por otro lado, también existen sustancias **inductoras de la gp-P:** son moléculas que aumentan la acción de la proteína aumentando la eliminación de los sustratos. Esto lo llevarían a cabo, estimulando la formación de ARNm que se traduce posteriormente en un incremento de la glicoproteína-P. Entre estos fármacos encontramos:

Rifampicina (antibiótico bactericida), corticoides (dexametasona, prednisona, Prednisolona).

<http://www.colvet.es/modules.php?name=revistas&sec=14&subsec=1&idwebstructure=277&idrevista=180>

En el presente trabajo de Tesis de Grado se pretende profundizar en el estudio del gen *MDR1* en las razas caninas Border Collie y Galgo.

5. Objetivos generales y específicos:

5.1. Objetivo General:

Analizar la presencia de la mutación *mdr1-1Δ* del gen *MDR1* (gen de resistencia múltiple a drogas) y en qué frecuencia se encuentra, en caninos de las razas Border Collie y galgo de Uruguay.

5.2. Objetivos específicos:

- Profundizar en el conocimiento del gen *MDR1* (de resistencia múltiple a drogas) involucrado en diferencias en la respuesta a fármacos empleados en la Clínica Veterinaria.
- Optimizar los protocolos de técnicas de extracción de ADN canino para el análisis de la mutación
- Ampliar el banco de ADN de caninos raza Border Collie y Galgo.
- Estudiar la presencia de la mutación *mdr1-1Δ* del gen de resistencia múltiple a drogas (*MDR1*), en dos muestras poblacionales de caninos de las razas Border Collie y Galgo de Uruguay.
- Analizar la frecuencia de la mutación *mdr1-1Δ* en las razas Border Collie y Galgo de Uruguay.

6. Especificaciones de las preguntas que busca responder el plan de trabajo

- La mutación del gen *MDR1*, *mdr1-1Δ*, ¿está presente en las muestras de ADN de caninos de las razas Border Collie y Galgo de nuestro país?
- ¿Cuáles son las frecuencias de la mutación *mdr1-1Δ* en las muestras de las razas estudiadas?
- ¿Qué frecuencia de homocigotos y heterocigotos se encuentran en ambas razas?
- ¿Cuál fue el mejor protocolo para extracción de ADN canino?

7. Materiales y métodos

7.1. Toma y conservación de muestras

Se analizaron muestras de 50 caninos, 25 de la raza Border Collie y 25 de la raza Galgo.

Las muestras de los animales, se identificaron con las letras BC y G (Border Collie y Galgo) respectivamente seguido del número de entrada al laboratorio.

Las muestras sanguíneas se tomaron de la vena antero braquial o de la safena, en condiciones de asepsia, desinfectándose la zona con alcohol y empleando materiales estériles (jeringas, mariposas, etc.). Se empleó EDTA como anticoagulante, las muestras se mantuvieron congeladas o refrigeradas hasta su procesamiento en el laboratorio.

Las muestras se tomaron con el consentimiento de los propietarios de los animales siguiendo las normas de la CHEA

Procedimiento de extracción de ADN EXTRACCIÓN DE ADN GENÓMICO A PARTIR DE SANGRE ENTERA

Animal Genomics, AgResearch Invermay, NZ, Abril 2008.

Técnica empleada en border collie para extracción de ADN

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 pipera 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 digerirá 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.

7.2. Procedimiento de extracción de ADN

EXTRACCIÓN DE ADN GENÓMICO A PARTIR DE SANGRE ENTERA

Animal Genomics, AgResearch Invermay, NZ, Abril 2008

Esta fue la técnica de extracción empleada en los galgos.

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 digirá 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.

Preparación de soluciones stock y de trabajo

SOLUCIÓN DE LISIS DE GLÓBULOS ROJOS (SLGR):

- SLGR Stock 20X (1 L)

Reactivo	g ó mL/L
NH ₄ Cl	160 g
NaHCO ₃ *	20 g
EDTA 0,5 M, pH 8,0	4 mL
Agua mQ	Hasta 1 L

* El protocolo original usa KHCO₃, pero las propiedades del NaHCO₃ son similares (se usan en la misma concentración).

SOLUCIÓN TRIS-BUFFERED SALINE, pH 7,4 (TBS):

- TBS Stock 20X (1 L)

Reactivo	g/L
NaCl	160
KCl	7,6
Trisma Base	60
Agua mQ	Hasta 1 L*

* Ajustar el pH final a 7,4.

SOLUCIÓN TRIS-EDTA, pH 8,0 (TE):

- TE Stock 10X (1 L)

Reactivo	mL/L
Tris 1 M, pH 8,0	100
EDTA 0,5 M, pH 8,0	2
Trisma Base	60
Agua mQ	Hasta 1 L

SOLUCIÓN DE DIGESTIÓN CON PROTEINASA K (PK):

- PK Stock 3X (1 L)

Reactivo	mg ó mL/L
EDTA 0,5 M, pH 8,0	300 mL
SDS 10%	210 mL
Proteinasa K	166 mg
Agua mQ	834 mL*

* Reservar a temperatura ambiente hasta su uso.

- **TRIS-HCl 1 M, pH 8,0:** Tris-HCl 1 M, pH 8,0 (100 mL)

Reactivo	g/100 mL
Trisma Base	12,1
Agua mQ	Hasta 100 mL*

* Disolver el Trisma en 80 mL de agua. Ajustar el pH a 8,0 con HCl 36% (4,2 mL), y llevar a 100 mL una vez ajustado.

EDTA 0,5 M, pH 8,0:

- EDTA 0,5 M, pH 8,0 (700 mL)

Reactivo	g/700 mL
Na ₂ EDTA	130,4
NaOH	21 gr
Agua mQ	Hasta 100 mL*

* Mezclar el EDTA con 350 mL de agua, agregar el NaOH suficiente para que se disuelva el EDTA (ya que se disuelve a pH superiores a 8,0). Ajustar el pH con HCl 36% (4,2 mL), llevar a 700 mL una vez ajustado.

* Preparar en un recipiente de capacidad superior a 1 L, ya que al tener SDS hace espuma. Guardar en freezer (-20 °C). Luego de descongelar la solución 3X y antes de preparar la solución 1 X, calentar a baño María a no mas de 20 °C para disolver el SDS (cuando la solución se vuelve transparente, el SDS se encuentra totalmente disuelto).

Las muestras de ADN obtenidas fueron medidas en Nanodrop (NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer, BCM) para conocer su concentración y pureza. El cual es un espectrofotómetro que permite la cuantificación de ácidos ribonucleicos, proteínas y ácidos desoxirribonucleico basándose en la absorbancia (260 nm para el ADN, 280 nm para las proteínas).

Previo a realizar esta extracción de ADN se emplearon otras técnicas que no dieron buenos resultados respecto de la concentración de ADN obtenida. Estas técnicas fueron:

Chélex 100. El chélex es una resina. La técnica consta de 4-5 lavados, posterior adición de 200 µl de chélex e incubación a 56°C durante 15 minutos y luego a 100°C durante 15 minutos.

Kit de extracción de Qiagen. DNeasy® Blood & Tissue Kit.

Técnica de extracción de ADN con cloruro de sodio.

7.3. Análisis de las muestras de ADN obtenidas

Las muestras analizadas se enviaron a genotipar al servicio GeneSeek, Neogen Corporation | 25155 Network Place| Chicago, Illinois 60673-1251. Los resultados se leyeron con el programa bioinformático BioEdit (acceso libre).

Fig. 3. En rojo y cursiva se muestra la región del gen *MDR1* que puede sufrir delección (*mdr1-1Δ*).

181 atgttcgct attcaaattg gcttgatagg ttgtatatgt tggggggac aatggctgcc
 241 atcatccatg gagctgcact ccctctcatg atgctggttt ttggaacat gacag^{*atagc*}
 301 ttgcaaattg caggaatttc aagaaacaaa actttccag ttataattaa tgaagatt

8. Resultados y Discusión

El ADN obtenido a partir de las muestras sanguíneas de las razas estudiadas (Border Collie y Galgo) fue analizado en NanoDrop con el fin de conocer su concentración y su pureza respecto a las proteínas y al ARN.

Los resultados que se obtuvieron de este análisis fueron los siguientes:

Tabla 1. Resultados del NanoDrop Border Collie

Border Collie	concentración de ADN(ng/μl)	260/280	260/230
1	15,4	1,17	
1	18,2	1,23	
2	16,0	1,33	
2	13,6	1,37	
3	59,7	1,43	
3	37,1	1,53	
4	264,4	1,8	
4	134,0	1,73	
5	108,6	1,75	
5	153,2	1,73	
6	4,2	2,17	0,39
6	3,6	4,63	0,07
7	5,5	1,98	0,39

7	8,6	2,88	0,18
8	4,5	2,86	0,27
8	5,3	5,08	0,12
9	3,8	3,42	0,24
9	12,8	2,5	0,28
10	5,7	2,15	0,34

Tabla 1 (continuación). Resultados del NanoDrop Border Collie

Border Collie	concentración de ADN(ng/μl)	260/280	260/230
10	6,8	3,94	0,16
11	13,7	1,38	0,35
12	72,5	1,26	1,20
12	16,1	1,27	0,29
13	10,2	1,66	0,18
13	21,7	1,70	0,33
14	12,3	1,54	0,24
14	100,7	1,81	0,95
15	20,4	1,71	0,39
15	22,7	1,44	0,38
16	22,4	1,32	0,15
16	19,0	1,48	0,12
17	51,9	1,62	0,25
17	17,5	1,22	0,09
18	14,3	1,22	0,10
18	16,4	1,51	0,10
19	10,8	1,27	0,10
19	7,4	1,29	0,08

20	8,9	1,35	0,06
20	6,4	1,42	0,05
21	13,7	3,25	0,08
21	8,6	8,98	0,06
22	12,6	1,68	0,05
22	26,6	1,84	0,07

Tabla 1 (continuación). Resultados del NanoDrop Border Collie

Border Collie	concentración de ADN (ng/μl)	260/280	260/230
23	18,2	1,27	0,06
23	24,4	1,29	0,09
24	286,0	1,84	0,97
24	12,6	1,63	0,06
25	57,9	1,22	0,76
25	89,2	1,25	0,60

Los resultados anteriores corresponden a la raza Border Collie. Se presenta cada animal (correspondiendo a cada número) dos veces debido a que por la técnica empleada se obtienen dos tubos.

Tabla 2. Resultados del NanoDrop Galgos

Galgos	concentración de ADN(ng/ul)	260/280	260/230
G1	26,2	2,79	1,00
G2	55,3	1,91	1,45
G3	58,5	2,04	1,41
G4	55,9	1,99	1,43
G5	56,0	1,97	1,40
G6	43,7	1,91	1,30
G7	49,9	1,92	1,32
G8	1628,7	1,81	2,12

G9	197,4	1,86	1,41
G10	132,9	1,87	1,41
G11	114,3	1,83	1,23
G12	50,0	1,86	1,39
G13	71,8 1,88 1,03		

Tabla 2 (continuación). Resultados del NanoDrop Galgos

Galgos	concentración de ADN (ng/ul)	260/280	260/230
G14	106,7	1,89	1,60
G15	66,2	1,87	1,57
G16	76,0	1,91	1,38
G17	73,7	1,75	0,87
G18	35,8	1,76	0,58
G19	4,9	1,29	0,29
G20	21,0	1,52	0,20
G21	15,5	1,67	0,25
G22	8,0	1,01	0,22
G23	71,2	1,63	0,94
G24	23,1	1,96	0,73
G25	22,8	1,71	0,46

Estos resultados corresponden a los obtenidos en las muestras de los perros de raza Galgo.

Las muestras de Border Collie fueron congeladas, mientras que la mayoría de las de Galgo se realizó la extracción de ADN a partir de sangre fresca, sin congelar. Por este motivo se considera que las concentraciones y purezas de las muestras de galgos son, en general, mejores que las obtenidas a partir de los Border Collie.

Dado que en el servicio GeneSeek donde se envían a genotipar las muestras, requieren un mínimo de 20 µl de volumen y una cantidad de ADN de 300 ng, no pudieron remitir todas las muestras. De las extracciones de ADN realizadas, se seleccionaron las que tenían mayor concentración de ADN, entre estas se encontraban:

Border Collie

1, 2, 3, 4, 5, 9, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 21, 22, 23, 24, 25.

Galgo

G1, G2, G3, G4, G5, G6, G7, G8, G9, G10, G11, G12, G13, G14, G15, G16, G17, G18, G20, G21, G23, G24, G25.

Pese a estas consideraciones, en el caso de los galgos, pudieron ser genotipadas todas las muestras; mientras que con los Border Collie no se dio la misma situación. En este último caso, pudieron analizarse nueve de las muestras, mientras que las otras nueve no se lograron genotipar. Esto puede deberse a la degradación del ADN, ya sea en la etapa de conservación (congeladas) o transporte. En el laboratorio donde fueron enviadas las muestras, las que fueron problemáticas, se las proceso nuevamente para así diluir los posibles contaminantes que pudieran estar interfiriendo con la lectura y fueron nuevamente medidas en el Nano Drop, obteniéndose resultados negativos y concluyendo lo antes mencionado, según comunicaron del propio servicio del laboratorio GeneSeek.

Las muestras que se pudieron analizar dieron los siguientes resultados:

Tabla 3. Genotipado Border Collie y Galgo

Muestra	ID	2 SNPs	SNP_ID	mdr1-1	mdr1-2
1	2		AGAT AGAT		
12	2		AGAT AGAT		
13	0				
14	0				
15	0				
16	0				
17	0				
18	0				
2	2		AGAT AGAT		

Tabla 3 (continuación). Genotipado Border Collie y Galgo

Muestra	ID	2 SNPs	SNP_ID	mdr1-1	mdr1-2
21	0				
22	2	AGAT	AGAT		
23	2	AGAT	AGAT		
24	2	AGAT	AGAT		
25	0				
3	2	AGAT	AGAT		
4	2	AGAT	AGAT		
5	2	AGAT	AGAT		
9	0				
G1	2	AGAT	AGAT		
G10	2	AGAT	AGAT		
G11	2	AGAT	AGAT		
G12	2	AGAT	AGAT		
G13	2	AGAT	AGAT		
G14	2	AGAT	AGAT		
G15	2	AGAT	AGAT		
G16	2	AGAT	AGAT		
G17	2	AGAT	AGAT		
G18	2	AGAT	AGAT		
G2	2	AGAT	AGAT		
G20	2	AGAT	AGAT		
G21	2	AGAT	AGAT		
G23	2	AGAT	AGAT		

Tabla 3 (continuación). Genotipado Border Collie y Galgo

Muestra ID	2 SNPs	SNP_ID	mdr1-1	mdr1-2
G24	2	AGAT AGAT		
G25	2	AGAT AGAT		
G3	2	AGAT AGAT		
G4	2	AGAT AGAT		
G5	2	AGAT AGAT		
G6	2	AGAT AGAT		
G7	2	AGAT AGAT		
G8	2	AGAT AGAT		
G9	2	AGAT AGAT		

En la tabla 5 se muestran los resultados obtenidos del genotipado de las muestras. Las muestras que identificadas con un número corresponden a los Border Collie, en los galgos el número esta precedido por la letra G.

En los resultados obtenidos, podemos ver que los animales estudiados no presentan la mutación *mdr1-1Δ* del gen *MDR1*. Esto se ve en cualquiera de la dos razas estudiadas (Border Collie y Galgo). En el primer caso, es de esperar este resultado dada las dificultades para obtener resultados de los genotipos de los animales. Nueve muestras son un número muy reducido como para poder considerar cualquier resultado con valor estadístico. De todas formas, trabajos anteriores realizados por otros autores determinaron que las frecuencias descritas en la raza Border Collie son bajas (Geyer *et al.*, 2005), incluso en otros trabajos se comunica la ausencia de la misma (Neff *et al.*, 2004).

En el caso de los galgos, se pudieron analizar 23 muestras. En ninguna de estas muestras se encontró la mutación. Según estudios previos (Neff *et al.*, 2004), en determinadas variedades de este grupo (whippet longhair), la mutación se encuentra en altas proporciones. El no haber encontrado la mutación en las muestras analizadas podría atribuirse a que en nuestro País no encontremos animales puros de la raza estudiada, siendo la mayoría cruza entre galgo criollo y greyhound, además de otras. De todas formas sería de interés aumentar el número de animales

a analizar, considerando la posibilidad de que en la población de galgos de nuestro país la mutación se encuentre en baja frecuencia.

En estudios previos realizados en nuestro país, donde se analizaron perros cimarrones y animales de la raza collie de Uruguay, se encontró que los únicos animales que presentaban la mutación eran los collie (Gagliardi, 2009). Dada la relación existente entre los Border Collie (estudiados en esta tesis) y los collie, donde se describió en primera instancia la mutación estudiada, es que se plantea el interés, entre otros puntos, de aumentar la muestra analizada de estos animales. En el trabajo desarrollado en esta tesis, no se detectó la mutación en ninguna de las dos razas estudiadas, pese a que en ambas razas se han descrito casos de reacciones adversas al tratamiento con ivermectina en la Clínica Veterinaria. Que se produzca este efecto reviste de una gran importancia ya que: a) podría suceder que la sensibilidad al fármaco se esté dando por Mutaciones en otros lugares del gen; b) que la misma se esté dando por mutaciones en otros genes.

Considerando que:

*Ambas posibilidades son planteadas en trabajos realizados previamente.

*En estos trabajos también se plantea que hay razas en las que no se describió la mutación *mdr1-1Δ* pero que sí presentan intoxicación. Esto estaría confirmando ambas posibilidades (Neff *et al.*, 2004).

Se piensa que en los casos analizados en este trabajo, el no haber encontrado la mutación puede ser debido, entre otros factores, a:

- Una baja frecuencia de la misma en las razas analizadas.
- Un tamaño de muestra bajo, en particular en los Border Collie.
- Cruzamientos dados sobre todo en los galgos
- Podría aparecer la mutación si se ampliara la población analizada

Conclusiones:

1. *En la presente tesis: se logro ampliar el banco de ADN de caninos existente en el Área Genética de la Facultad de Veterinaria con muestras de las razas border collie y galgo.*
2. *El protocolo de extracción de ADN más adecuado para el estudio de genotipado de la mutación MDR1 fue en la que se utilizó la solución de acetato de potasio.*
3. *En las muestras analizadas de la raza border collie y galgos no se identificó la Mutación del gen MDR1 ($mdr1-1\Delta$) siendo el 100% de los animales estudiados homocigotas dominantes*

9. Perspectivas futuras

Este gen MDR1 presenta una gran importancia en diversos aspectos de la Clínica Veterinaria, como ser, entre otros:

- *La glucoproteína-P, producto de este gen, interactúa con diversos fármacos además de con la ivermectina.*
- *Se encuentra relacionado a casos de resistencia de diferentes parásitos a los tratamientos antihelmínticos. Esto se ha visto en diferentes especies como ser en ovinos.*
- *Dificultades al momento de realizar tratamientos antineoplásicos.*
- *Asociación con diversas patologías (esto se ha descrito con mayor detalle en humanos).*

Los puntos mencionados anteriormente llevan a que se tengan perspectivas futuras a seguir estudiando.

10. Bibliografía

1-Ballent, M, Lifschitz, A, Virkel, G, Lanusse, C (2005). Implicancias fisiofarmacológicas de la glucoproteína-P en animales domésticos. *Analecta veterinaria* ; 25 (2): 36 – 47

2-Craig L, Rommel G, Richard B (2003). Pharmacogenetics of ATP-binding Cassette Transporters in Cancer and Chemotherapy. 2: 685-698.

3-Dean M, Rzhetsky A, Allikmets R (2001). The human ATP - binding cassette (ABC) transporter superfamily. *Genome Res*; 11 (7): 1156 - 66

4-Fernandez J, Crombet O, Villares I, Pons R (1998). Resistencia a drogas mediada por la glucoproteína-P. *Revista Cubana de Oncología*; 14 (2): 111-120.

5- Gagliardi, R. (2009) Estudios genéticos en caninos de raza Cimarrón Uruguayo (*canis familiaris*). Tesis de Maestría, PEDECIBA, UdelaR. Subárea Genética.

6-Geyer, J, Döring, B, Godoy, J.R, 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.

7-González Canga A, Fernández Martínez N, Sahagún Prieto A, García Vieitez J, Díez Liébana MJ, Tamame Martín PP, Sierra Vega M. (2010). Seguridad de la ivermectina: toxicidad y reacciones adversas en especies de mamíferos *Revista. Medicina veterinaria y zootecnia. Córdoba* .15 (2): 2129-2137.

8-Gottesman M.M, Pastan I. (1988). Resistance to multiple chemotherapeutic agents in human cancer cells. *Trends in Pharmacological Science* 9: 54-58.

9-Ieiri I, Takane H, Otsubo K. (2004). The MDR1 (ABCB1) gene polymorphism and its clinical implications. *Clinical Pharmacokinetics*. 43: 553 - 576

10-Juliano, R.L, Ling, V.T. (1976). A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants. *Biochim. Biophys. Acta* 450: 152.

11-Lehn, L.R, Correa, N.C. (2006). Multi-drug resistance (MDR1) gene and P-glycoprotein influence on pharmacokinetic and pharmacodynamic of therapeutic drugs. *Ciência Rural, Santa Maria*, 36(1): 336-341

12-Mealey, K.L., Bentjen, S.A., Gay, J.M., Cantor, G.H. (2001). Ivermectin sensitivity in collies is associated with a deletion mutation of the *mdr1* gene. *Pharmacogenetics*, 11: 727-733.

13-Neff MW, Robertson KR, Wong AK., Safra N., Broman W., Slatkin M. (2004). Breed distribution and history of canine MDR1-1 Delta, a pharmacogenetic mutation that marks the emergence of breeds from the collie lineage. *Proc Natl Acad Sci USA* ; 101: 11725-11730

14-Twom-Danso N.A. (2003). Serious adverse events following treatment with ivermectin for onchocerciasis control: a review of reported cases. *Filaria Journal* ; 2 (suppl.1), S3.

15-Weinstein RS, Grogan TM, Kuszak JR, Jakate SM, Kluskens LF, Coon JS (1991). Multidrug resistance gene product (P-glycoprotein) in normal tissues and tumors. **In:** *Advances in Pathology and Laboratory Medicine*: pp. 207-234. Mosby-Year Book, St. Louis, MO.

16-Walsh, P.S., Metzger, D.A., Higuchi, R. (1991). Chelex 100 as a Medium for Simple Extraction of DNA PCR-Based Typing from Forensic Material. *Biotechniques*; 10(4): 506-513.

17-Wilk JN. (2005). The *mdr1a*^{-/-} mouse model of spontaneous colitis: a relevant and appropriate animal model to study inflammatory bowel disease. *Immunologic Research*, 31(2): 151-160.

Cristina Mendez. La glicoproteína P y la resistencia a fármacos. Disponible en: <http://www.encuentros.uma.es/encuentros33/glicoprot33.html> (consultado: 10 de octubre, 2011).

Dra: Maria Isabel Peláez de lucas. La sensibilidad de los collies a los medicamentos y el gen MDR1. Disponible en: <http://www.colvet.es/modules.php?name=revistas&sec=14&subsec=1&idwebstructure=277&idrevista=180> (consultado el 18 de mayo 2012).

Dra. M^a Isabel Peláez de Lucas. La mutación *mdr1* es la causa de la toxicidad producida por distintos medicamentos en los collies y otras razas de perros <http://www.legadodeloslobos.com/articuloscollie/Mdr1%20para%20web%20Legado.pdf> (consultado 3 de octubre de 2012)