



**UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS**

Trabajo de Tesis realizado como requisito para optar al título de
DOCTOR EN CIENCIAS VETERINARIAS

**ESTIMACIÓN DE LA PREVALENCIA EN ARGENTINA DE
MUTACIONES CAUSALES DE ENFERMEDADES CANINAS:
GEN DE RESISTENCIA A MULTIDROGAS 1, VON
WILLEBRAND TIPO I Y DEGENERACIÓN PROGRESIVA DE
CONOS Y BASTONES**

Autor: Lic. CRESPI, Julián Alejandro

Directores: Dra. Pilar Peral García y Dr. Guillermo Giovambattista
Instituto de Genética Veterinaria "Ing. Fernando Noel Dulout (IGEVEVET)
Cátedra de Genética General. FCV-UNLP

Miembros del jurado

Dra. Soria Liliana Araceli, Dra. Corrada Yanina Alejandra,
Dr. Miragaya Marcelo

2019

Dedicatoria

La presente tesis la dedico a mi familia, a mis padres que fueron y son el pilar fundamental a lo largo de toda mi formación como profesional y persona, por darme la confianza, consejos, oportunidad y recursos para lograrlo. A mi mujer y mis hijos, gracias por estar siempre en todo momento brindándome su amor, paciencia y comprensión.

Gracias.

Agradecimientos

Agradezco profundamente a:

-La Facultad de Ciencias Veterinarias por abrirme sus puertas para realizar esta tesis.

-Al Instituto de Genética Veterinaria “Ing. Fernando Noel Dulout”, por brindarme los recursos y el espacio necesarios para llevar a cabo este trabajo.

- A mis padres, por el ejemplo y apoyo en todo lo que hice.

- A Lu, Salvi y Mateo, gracias por todo, los amo.

- A la Dra. Pilar Peral García y al Dr. Guillermo Giovambattista que me incentivaron y dieron la posibilidad de realizar en este trabajo bajo su dirección. Por la atención, el tiempo, la buena predisposición y el respeto brindado.

- A Egle y Diego, por su valiosa amistad, compañía, experiencia, predisposición, y momentos vividos. Muchas gracias

-A Laurita por su ayuda incondicional, mucho de este trabajo es de ella.

-A Agus, Clau, Analia por su ayuda y por todos los tiempos compartidos.

-Al Servicio del Laboratorio Central del Hospital Escuela de la Facultad de Ciencias Veterinarias – UNLP,

- A Eugenia Pintos, siempre dispuesta a ayudarme, gracias.

- A Gustavo Zapata, siempre dispuesto a dar una mano, facilitando muestras, estudios y apoyo.

- A todos los integrantes del IGEVET, que aportaron de maneras diversas al desarrollo de este trabajo y con quienes compartí gratos momentos.

Muchas Gracias.

PUBLICACIONES PARCIALES DEL TRABAJO DE TESIS

PUBLICACIONES

- von Willebrand disease type 1 in Doberman Pinscher dogs: Genotyping and prevalence of the mutation in the Buenos Aires region, Argentina. **Crespi J**, Barrientos L, Giovambattista G. Journal of Veterinary Diagnostic Investigation. 2018. Doi: 10.1177/1040638717750
- Detección mediante pirosecuenciación de la mutación nt230 [del4] del gen *ABCB1* canino y determinación de su prevalencia en razas de perros pastores en la provincia de Buenos Aires. **Crespi JA**, Barrientos LS, Arizmendi A, Peral García P, Giovambattista G. Revista Analecta Veterinaria, Facultad de Ciencias Veterinarias- UNLP. 2018. doi: 10.24215/15142590e019

PRESENTACIONES A REUNIONES CIENTIFICAS

- Tipificación de la mutación causal de la Enfermedad de von Willebrand tipo 1 en Doberman. XLIII Congreso Argentino De Genética IV Reunión SAG – La Pampa Patagonia Bariloche. Octubre de 2014. **Crespi JA**, Barrientos LS, Posik DM, Giovambattista G.
- Desarrollo de un método de diagnóstico de la mutación nt230 [del4] del gen canino *abcb1* basado en Pirosecuenciación. XVI Congreso Latinoamericano de Genética - IV Congreso de la Sociedad Uruguaya de Genética - XLIX Reunión Anual de la Sociedad de Genética de Chile - XLV Congreso Argentino de Genética. Octubre 2016. **Crespi JA**, Barrientos LS, Castillo NS, Giovambattista G.

- Presentación del trabajo de tesis parcial: Estimación de la Prevalencia en Argentina de Mutaciones Causales de enfermedades caninas, Gen de Resistencia a Multidrogas 1, Von Willebrand Tipo 1 y Degeneración Progresiva de Conos y Bastones. **Crespi JA**. I Jornadas de Divulgación Científica del IGEVET, Centro Científico Tecnológico La Plata. Diciembre 2015.
- Desarrollo de un método de diagnóstico de la mutación nt230 [del4] del gen canino ABCB1 basado en pirosecuenciación **Crespi JA**, Barrientos L, Castillo N, Posik D, Giovambattista G. II Jornadas de Divulgación Científica del IGEVET, Centro Científico Tecnológico La Plata. Diciembre 2016

INDICE DE CONTENIDOS

RESUMEN.....XVI

SUMMARY.....XVII

INTRODUCCION

Generalidades..... 2

Enfermedades Hereditarias..... 2

Enfermedades de origen Genético en perros..... 5

Tipo y origen de enfermedades genéticas en perros..... 5

Diversidad genética..... 8

Clasificación de las enfermedades genéticas caninas..... 10

Origen del perro doméstico..... 12

Las razas caninas argentinas..... 15

Importancias de la producción canina en Argentina..... 19

El perro como modelo de experimentación en el estudio de enfermedades humanas..... 19

Degeneración progresiva de conos y bastones 22

Enfermedades retinianas congénitas..... 25

Atrofia progresiva de retina..... 26

Degeneración progresiva de conos y bastones..... 29

Métodos de estudio y diagnóstico..... 30

Genética y herencia..... 32

PRCD en el mundo..... 33

PRCD en Argentina..... 35

Enfermedad de von Willebrand tipo I..... 36

Factor de coagulación de von Willebrand..... 41

La enfermedad de von Willebrand..... 42

Métodos de diagnóstico..... 44

Genética y herencia..... 50

EvW tipo I en el mundo..... 52

EvW tipo I en Argentina..... 53

Gen de Resistencia a multidroga	54
Importancia de la sensibilidad a fármacos en perros.....	57
Métodos de estudio y diagnóstico.....	61
Genética y herencia.....	62
Mutación nt 230 (del4) en el mundo.....	64
Mutación nt 230 (del4) en Argentina.....	68

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Hipótesis.....	70
Objetivo general.....	71
Objetivos específicos.....	71

MATERIALES Y MÉTODOS

Autorización del proyecto.....	73
Animales de experimentación.....	73
Tipos de muestras	76
Datos obtenidos de los animales	77
Exámenes clínicos.....	77
Procesamiento de las muestras.....	80
Extracción de ADN.....	80
Cuantificación del ADN extraído.....	80
Genotipificación.....	82
Secuencias utilizadas.....	84
Gen PRCD – Progressive Rod Cone Degeneration.....	84
Gen vWF I – von Willebrand Factor.....	84
Gen ABCB1 – ATP Binding cassette-Sub-Family B, member 1	84
Secuenciación de los productos amplificados.....	85
Pirosecuenciación.....	89
Secuenciación masiva- NGS (Next Generation Sequence).....	95
Lectura e interpretación de los datos obtenidos por secuenciación y Pirosecuenciación.....	97

RESULTADOS

Degeneración Progresiva de conos y Bastones

Amplificado del fragmento de interés.....	101
Secuenciación.....	101
Genotipado por Pirosecuenciación.....	103
Genotipado por NGS.....	103
Análisis estadístico.....	106

Enfermedad de von Willebrand Tipo I

Amplificado del fragmento de interés.....	108
Secuenciación.....	108
Genotipado por Pirosecuenciación.....	110
Genotipado por NGS.....	110
Análisis estadístico.....	113
Análisis de los signos clínicos.....	116

Gen de Resistencia a Multidrogas 1 MDR 1 (ABCB1)

Amplificado del fragmento de interés.....	121
Secuenciación.....	121
Genotipado por Pirosecuenciación.....	124
Análisis estadístico.....	125

DISCUSIÓN.....	129
-----------------------	------------

CONCLUSIONES.....	147
--------------------------	------------

BIBLIOGRAFÍA.....	152
--------------------------	------------

ANEXOS.....	172
--------------------	------------

ÍNDICE DE LAS FIGURAS

1.	Representación esquemática de los fenómenos de cuello de botella (a) y de efecto fundador (b)	7
2.	Centros de domesticación e historia de la migración y evolución del perro doméstico.....	13
3.	Árbol filogenético del perro. Cada color representa las razas morfofuncionales. Basado en datos de secuenciación masiva.....	14
4.	Cronología de los estudios preclínicos en perros con trastornos hereditarios de la coagulación desde la década de 1940 hasta la actualidad.....	40
5.	Esquema que muestra el sitio de empalme en comparación entre un alelo normal y uno mutado para el gen de vWF.....	49
6.	Diagrama representando las relaciones históricas reportadas entre las razas de pastoreo contemporáneas que comparten el linaje collie fuera de Gran Bretaña.....	60
7.	Toma de tiempo de sangría por el método de Duke.....	79
8.	Gel de agarosa 1%, utilizado para confirmar la presencia de ADN genómico.....	81
9.	Espectrofotómetro Nanovue (GE Healthcare).....	81
10.	Termocicladores utilizados en el estudio. Biorad – My Cyclers™ Thermal Cyclers (a) y Axygene Maxigene (b).....	85
11.	Principio básico de secuenciación directa por capilar.....	88
12.	Secuenciador Genetic Analyzer abi 3500 – Applied Biosystem. ...	88
13.	Principio básico de pirosecuenciación.....	91

14. Obtención del fragmento biotinilado para su utilización en la pirosecuenciación mediante el fragmento universal de M13 añadido al primer específico.....	92
15. Pirosecuenciador Psqtm 96 System Instrument (Qiagen).....	94
16. Esquema del mecanismo de secuenciación masiva por Ion Torrent e Illumina.....	96
17. Gel de poliacrilamida 6%. Fragmento amplificado por pcr del gen PRCD de 80 pares de bases (pb).....	102
18. Electroferogramas obtenidos por secuenciación del fragmento del gen PRCD	102
19. Pirogramas obtenidos por pirosecuenciación del fragmento del gen PRCD	104
20. Frecuencias génicas de los animales analizados teniendo en cuenta el sexo en Labradores y en Caniche Toy. p = frecuencia alélica del alelo normal (G), y q frecuencia alélica del alelo mutado (A).....	107
21. Gel de poliacrilamida 6% amplificados del gen vWF por pcr.....	109
22. Electroferogramas obtenidos por secuenciación del fragmento del gen vWF donde se observa el sitio de la mutación c.7437 g> a.....	109
23. Genotipos obtenidos por pirosecuenciación del gen vWF.....	111
24. Gráficos diferenciando los animales analizados teniendo en cuenta el sexo (a) y el color de capa (b).....	115
25. Relación entre genotipos y los valores obtenidos de tiempo de sangría, tiempo de protrombina (PT), recuento de plaquetas, y tiempo de trombolastinan parcialactivada (kPTT).....	115

26. Pedigries reconstruidos para los dos grupos que presentaban animales emparentados. Con una flecha se señala el ancestro común entre ambas familias.....	120
27. Gel de poliacrilamida 6%. Amplificado de fragmento de 150 pb del gen ABCB1.....	122
28. Electroferogramas obtenidos por secuenciación del fragmento del gen ABCB1 donde se observa el sitio de la mutación nt230 [del4].....	123
29. Genotipos obtenidos por pirosecuenciación para la mutación del gen ABCB1.....	124
30. Frecuencias de los alelos p = normal y q = mutado para las razas collie, border collie, el total de la población y en otras se incluyen al pastor de shetland y el grupo de perros de otras razas no pastores.....	127
31. Frecuencias genotípicas observadas en distintos países para el gen abcb1.....	144
32. Frecuencias alélicas para el alelo mutado del gen ABCB1 en distintos países.....	144
33. Toma de muestra de sangre de vena safena.....	176
34. Toma de tiempo de sangría en mucosa.....	179

INDICE DE TABLAS

1. Grupos raciales de perros según la clasificación propuesta por la Federación Cinológica Internacional (FCI).....	15
2. Número de animales inscriptos por raza, por la Federación Cinológica Argentina, durante los años 2016 y 2017.....	17
3. Frecuencias alélicas y genotípicas relacionadas a PRCD 1 en diferentes razas en la republica checa.....	34
4. Frecuencia de alelo mutado (prcd) y de animales portadores y afectados en perros de la raza Caniche Toy, Chihuahua y Dachshund miniatura.....	34
5. Revisión de los criterios para el diagnóstico de EvW I en perros de raza Doberman.....	46
6. Frecuencia alélica de la mutación nt 230 (del4) y genotípicas para las distintas razas analizadas en países europeos.....	67
7. Frecuencias alélicas y genotípicas en los distintos países de la mutación nt 230 (del4).....	67
8. Razas incluidas para el estudio de las enfermedad de atrofia progresiva de retina - degeneración progresiva de conos y bastones (PRCD), von Willebrand tipo I (EvW I), y Gen de Resistencia a Multidrogas 1 (ABCB1).....	74
9. Tabla con los primers diseñados para la amplificación de los fragmentos analizados.....	83

10. Genotipos obtenidos por las técnicas de pirosecuenciación y NGS target de 19 perros raza Caniche Toy.....105
11. Frecuencias genotípicas y génicas; “g” alelo norma y “a” alelo mutado, p y q respectivamente para el gen PRCD.....107
12. Genotipos obtenidos por las técnicas de pirosecuenciación y NGS para la mutación de EvW tipo I.....112
13. Frecuencias génicas y genotípicas de la mutación c.7437g>a del gen vWF obtenidas en la población total, en los dos grupos de animales relacionados entre sí y en los animales no relacionados.....114
14. Presencia o ausencia de signos clínicos teniendo en cuenta los genotipos posibles para la mutación c.7437g>a del gen vWF.....117
15. Resultados de los análisis de hematocrito (hem), conteo de plaquetas (plat), y test de coagulación: tiempo de sangría bt, tiempo de trombolastina parcial activada (kptt), tiempo de protrombina (pt). Sexo (sx) y genotipo.....118
16. Frecuencias alélicas del total de los animales genotipados para la mutación nt230 [del4] del gen ABCB1. p= alelo ATAG; q = alelo con la deleción.....126
17. Frecuencias genotípicas para del gen ABCB1. (+/+) Genotipo homocigota normal, (- / -) Genotipo homocigota mutado, (+/-) Genotipo heterocigota. HWE: equilibrio de Hardy-Weinberg, H_e: Heterocigosidad esperada, H_o: Heterocigosidad observada.....128
18. Valores de las diferencias génicas de la mutación nt230 (del4) del gen ABCB1 entre los grupos estudiados.....128

19. Frecuencias génicas del alelo mutado (q) en las razas Labrador y Caniche Toy en distintos países.....138
20. Cuadro comparativo de la frecuencia de la mutación (q) nt230 [del4] del gen ABCB1 canino entre las frecuencias genotípicas reportadas en otros países y las encontradas en este estudio para la raza Collie. (+): Alelo normal (-): Alelo mutado, (n) número de animales, (+/+) Genotipo homocigota normal, (+/-) Genotipo heterocigota, (-/-) Genotipo homocigota mutado.....143
21. Frecuencias génicas del alelo mutado nt230 [del4] (q) en la raza Border Collie en distintos países.....146
22. Frecuencias génicas del alelo mutado nt230 [del4] (q) en la raza Pastor de Sheetland en distintos países.....146

ABREVIATURAS

ADN: Ácido desoxirribonucleico.

AKC: American Kennel Club.

FCI: Federación Cinológica Internacional

FCA: Federación Cinológica Argentina

OMIA: Online Mendelian Inheritance In Animals

PRCD: Degeneración progresiva de conos y bastones

EvW: Enfermedad de von Willebrand

MDR1: Multi Drugs Resistance

ddNTPs: didesoxi-dinucleótidos trifosfato.

dNTPs: dinucleótidos trifosfato.

EDTA: Etilendiaminotetraacético (anticoagulante).

H_e: heterocigocidad esperada

H_o: heterocigocidad observada.

HWE: Hardy-Weinberg Equilibrium (Equilibrio de Hardy-Weinberg).

ERG: Electrorretinografía

IC: Intervalo de confianza.

INDEL: Inserción-Delección (Tipo de polimorfismo genético).

kb: kilobases (1000 pb).

mM: milimolar.

ng: nanogramo.

μl: microlitro

pb: pares de bases (distancia genética).

PCR: Polymerase Chain Reaction (Reacción en cadena de la polimerasa).

SBT: Tipificación basada en secuenciación.

SNP: Single Nucleotide Polymorphism (Polimorfismo de nucleótido simple)

STR: Short tandem repeat (microsatélites)

NGS: Next Generation Sequencing.

ESTIMACIÓN DE LA PREVALENCIA EN ARGENTINA DE MUTACIONES CAUSALES DE ENFERMEDADES CANINAS: GEN DE RESISTENCIA A MULTIDROGAS 1, VON WILLEBRAND TIPO I Y DEGENERACIÓN PROGRESIVA DE CONOS Y BASTONES

RESUMEN

Existen aproximadamente 700 enfermedades en caninos de origen genético de las cuales solo el 30% tiene descrita la mutación causal. El incremento de la prevalencia de éstas se debe a la gran presión de selección en la formación de las razas. El objetivo de esta tesis fue obtener un primer registro poblacional en Argentina de tres enfermedades de origen genético. Para este fin se desarrolló un método de genotipado basado en pirosecuenciación de las mutaciones causales de la Degeneración progresiva de conos y bastones (PRCD), Enfermedad de von Willebrand (EvW) y de la Sensibilidad a fármacos (MDR1 /ABCB1).

La **PRCD** es un tipo de atrofia de retina que afecta perros de diferentes razas a partir de los 3 – 5 años, causada por una puntual G>A en el exón 1 del gen PRCD. En este trabajo la frecuencia encontrada del alelo que ocasiona la enfermedad en Caniche Toy fue de 0,2 y la frecuencia encontrada en la población analizada de Labradores Retriever fue de 0,06. La **EvW** está determinada por la carencia del factor de coagulación von Willebrand (FvW). La enfermedad de tipo 1 es la de mayor ocurrencia

principalmente en la raza Doberman y está ocasionada por una mutación puntual G>A en el exón 43 del gen que codifica para el FvW. Los resultados obtenidos sobre una población local de Doberman fueron de una frecuencia del alelo mutado de 0,41. En perros de raza Collie se han descrito efectos colaterales neurotóxicos en la administración de ciertos fármacos, consecuencia de una mutación sin sentido en el gen **MDR1** de la bomba de eflujo de la gp-P. Sobre 72 perros estudiados se encontró una frecuencia del alelo mutado en Collies de 0,32 y en Border Collie de 0.06.

La detección molecular por pirosecuenciación permitió confirmar la presencia en Argentina de alelos causales de las enfermedades PRCD, Ewv Tipo I y MDR1. La obtención de un diagnóstico rápido y a edades tempranas de los animales posibilitaría establecer planes de reproducción y cría de tal manera que las frecuencias de los alelos mutados se reduzcan en las poblaciones y aumenten los animales libres de estas enfermedades.

PALABRAS CLAVE

Diagnóstico genético, Enfermedades genéticas, Perros
Prevalencia.

ESTIMATION OF THE PREVALENCE IN ARGENTINA OF CAUSAL MUTATIONS OF CANINE DISEASES: GEN OF RESISTANCE TO MULTI-DRUGS 1, VON WILLEBRAND TYPE I AND PROGRESSIVE DEGENERATION OF ROD AND CONES

SUMMARY

Exits approximately 700 canine genetic diseases affect dogs worldwide, However, disease-causing mutations have been described in only 30% of them. The increased number of genetic disorders is mainly due to breed formation and selection. The aim of the present doctoral thesis was to create the first national registry of prevalence and frequency of mutations of three genetic disorders affecting dog populations from Argentina. Accordingly, we developed a pyrosequencing-based method for detection of causative mutation of Progressive rod-cone degeneration (PRCD), von Willebrand Disease type I (vWD) and Multi drugs resistance gene (MDR1/ABCB1).

PRCD is a retinal disorder affecting several breeds since 3-5 years old The responsible gene mutation is a G>A change in exon 1 of PRCD gene. In the present work, allele frequency of PRCD-causing mutation was 0.2 in Toy poodles and 0.06 in Golden Retrievers. **vWD** is a disorder caused by missing or deficient plasma von Willebrand factor (VWF). Of the three types of the disease, vWD type 1 is the most common, mainly in Doberman breed and is caused by a G>A mutation at exon 43 of vWF gene. In our study, in a local sample of Doberman dogs vWD mutated allele frequency was 0.41.

In Collie breed dogs, neurotoxic effects after administration of several drugs have been described as a result of higher sensitivity due to a nonsense mutation in the MDR1 gene efflux pump (P-gp). Mutant allele frequencies in our sample of 72 dogs were Collies, 0.32 and Border Collie, 0.06.

The molecular detection by pyrosequencing confirmed the presence in Argentina of disease-causing mutations for PRCD , vWD I and MDR1. Early diagnosis of these genetic disorders at early ages of dogs would allow the development of reproduction and breeding programs aimed at decreasing mutant allele frequencies and increasing the frequency of dogs free of such diseases.

KEY WORDS

Genetic diagnosis, Genetic diseases, Dogs, Prevalence,

INTRODUCCIÓN

GENERALIDADES

Enfermedades Hereditarias

El término enfermedad proviene del latín *infirmitas*, que significa literalmente “falta de firmeza”.

Uno de los mayores logros de la década del 50, que estableció las bases de lo que hoy se conoce como Genética Molecular, fue la descripción por James Watson y Francis Crick (1953) de la estructura física del ADN. Recién en el año 1956, se determinó que la especie humana portaba 46 cromosomas. Este hecho permitió determinar en el año 1959 que el síndrome de Down estaba causado por una copia extra del cromosoma 21. Posteriormente, durante las décadas del 60 y 70 se produjo un gran desarrollo de tecnologías de genética molecular, lo que permitió la concientización sobre el papel de los *determinantes genéticos* en las enfermedades humanas.

En las pasadas décadas se han identificado aproximadamente 1.500 genes cuya **alteración** es “*causa de enfermedad*”.

Una mutación es un cambio heredable en el ADN, ya se trate de un gran cambio como la pérdida o ganancia de un cromosoma entero, o bien de un pequeño cambio denominado habitualmente mutación puntual. Una vez producido un cambio en el ADN en la línea germinal, puede transmitirse a generaciones sucesivas, hecho que no ocurre cuando la mutaciones afectan a las células somáticas.

De acuerdo a sus efectos en el individuo, los cambios del ADN pueden clasificarse en:

a) silenciosos (o neutros) cuando no suponen ni ventaja ni inconveniente;

b) patogénicos cuando causan o incrementan el riesgo de aparición de una enfermedad;

c) ventajosos cuando suponen alguna ventaja para el individuo o la especie.

A veces se emplea coloquialmente el término “mutación” como sinónimo de “mutación patogénica”, y el término “polimorfismo” como sinónimo de “mutación neutra”, pero estrictamente, desde el punto de vista químico, una mutación es tan sólo cualquier cambio en el ADN, ya sea neutro o patogénico. Cuando esta mutación se mantiene en la población con una frecuencia alélica de al menos el 1% es considerada un polimorfismo (Ford y col., 1965; Cavalli-Sforza y col., 1981).

La gran mayoría de los cambios son neutros. Básicamente, los cambios patogénicos y las enfermedades producidas por ellos pueden clasificarse, teniendo en cuenta el tipo de cromosoma en el que se halla la alteración y a la forma en cómo se transmiten a través de las generaciones en: autosómicos dominantes, autosómicos recesivos, ligados al cromosoma X, y de herencia materna (ADN mitocondrial). En ocasiones, la identificación de un patrón de herencia claro se ve dificultado por la existencia de factores que modifican la expresión y penetrancia de las alteraciones moleculares. Pero incluso teniendo en cuenta estos factores modificadores, existen muchas enfermedades hereditarias que no siguen ninguno de los patrones básicos de herencia.

Muchas de estas enfermedades se conocen con el nombre de complejas o multifactoriales. Finalmente, hay que considerar también las enfermedades génicas adquiridas, como el cáncer, que suelen ser el resultado de mutaciones somáticas (Oliva y col., 2004).

El éxito de la supervivencia de los embriones de cualquier especie animal durante su etapa embrionaria depende de que posean la información genética adecuada y un ambiente óptimo donde desarrollarse. Ante alteraciones en el material genético o la presencia de agentes nocivos, es probable que ocurran alteraciones en el desarrollo o malformaciones congénitas. Se define entonces, como alteración congénita, a aquellos defectos estructurales y/o funcionales presentes en el momento del nacimiento. Algunas de ellas provocan la muerte embrionaria, otras no son diagnosticadas sino hasta el nacimiento y muchas otras no se descubren hasta etapas posteriores de la vida. Estos defectos se originan en la falla de algunos de los diferentes niveles de organización del cuerpo, durante el desarrollo embrionario, abarcando desde el nivel molecular hasta el orgánico. Una alteración congénita puede ser el resultado del acervo genético y factores ambientales. Expresado de otra forma, las enfermedades congénitas pueden estar determinadas por causas genéticas, cuando el origen del defecto se encuentra en los genes o en los cromosomas como resultado del proceso de mutación, considerándose una mutación a un cambio en la secuencia de bases del ADN que altera la cantidad, calidad y ordenamiento de los aminoácidos que constituyen una proteína. Este cambio puede ser

espontáneo o bien ser inducido. En algunos casos la alteración genética puede estar circunscripta a un grupo celular en particular y afectar a un determinado tejido u órgano. En otros casos la alteración puede afectar al genoma de las células germinales (ovogonias y espermatogonias), determinando que la patología no sólo sea genética, sino también hereditaria, ya que se “trasladará” a los óvulos y espermatozoides que ellas originen. Una patología será entonces: a) hereditaria cuando puede ser transmitida a la descendencia del individuo, b) ambiental, cuando distintos factores externos (radiaciones, temperatura, tóxicos, virus, etc.) provocan un desarrollo embrionario o fetal alterado, sin afectar el genoma del individuo y c) multifactorial, cuando ambos factores, genotipo y ambiente, se combinan llevando a un desarrollo anormal (Conte y col., 2004).

Enfermedades de origen genético en perros

Tipo y origen de enfermedades genéticas en perros.

Como se mencionó anteriormente, se definen como enfermedades de origen genético a las afecciones causadas por alteraciones en el genoma. La gran mayoría de ellas son hereditarias y pueden ser clasificadas como monogénicas (atribuidas a la variación en un solo gen), poligénicas (atribuidas a la variación en varios genes) o multifactoriales (con base genética y ambiental).

En la especie canina debido a la selección y a la formación de las razas, se observa gran variabilidad fenotípica entre ellas.

A modo de ejemplo, en la característica del tamaño del animal, se puede observar que la diferencia entre animales de una raza pequeña como el Chihuahua y una más grande como el Gran Danés es de 40 veces (Wayne y Ostrander, 2007).

Debido al origen de un reducido **grupo fundador** y a las restricciones generadas por el modo de cría de las diferentes razas, se observa una estructura poblacional particular en donde cada raza se encuentra aislada genéticamente (Parker y col., 2004). A su vez, cada raza presenta una variabilidad genética reducida y un reducido tamaño efectivo de la población, debido básicamente a dos eventos de **cuello de botella**: el primero ocurrido durante la domesticación del perro y el segundo sucedido al momento de creación de las diferentes razas (Figura 1.A). Además, tiene que tenerse en cuenta el efecto producido por la selección a favor de ciertas características fenotípicas específicas (estándar racial) y al uso repetido de los mismos reproductores (“popular sire”) (Mellanby y col., 2013). A este fenómeno se le llama **efecto fundador** (Figura 1.B). Por lo tanto, se pierde variabilidad genética cuando se establece una nueva población a partir de un número pequeño de individuos perteneciente a una población más grande, obteniéndose como resultado, individuos genética y fenotípicamente diferentes a la población original (menor heterocigosidad) (Hedrick, 2005).

“La sobrerrepresentación del genoma del pequeño grupo de reproductores fundadores genera un aumento de la frecuencia de alelos recesivos deletéreos e incrementa la probabilidad de alelos indeseables idénticos por descendencia en la próxima generación (Calboli y col., 2008)”.

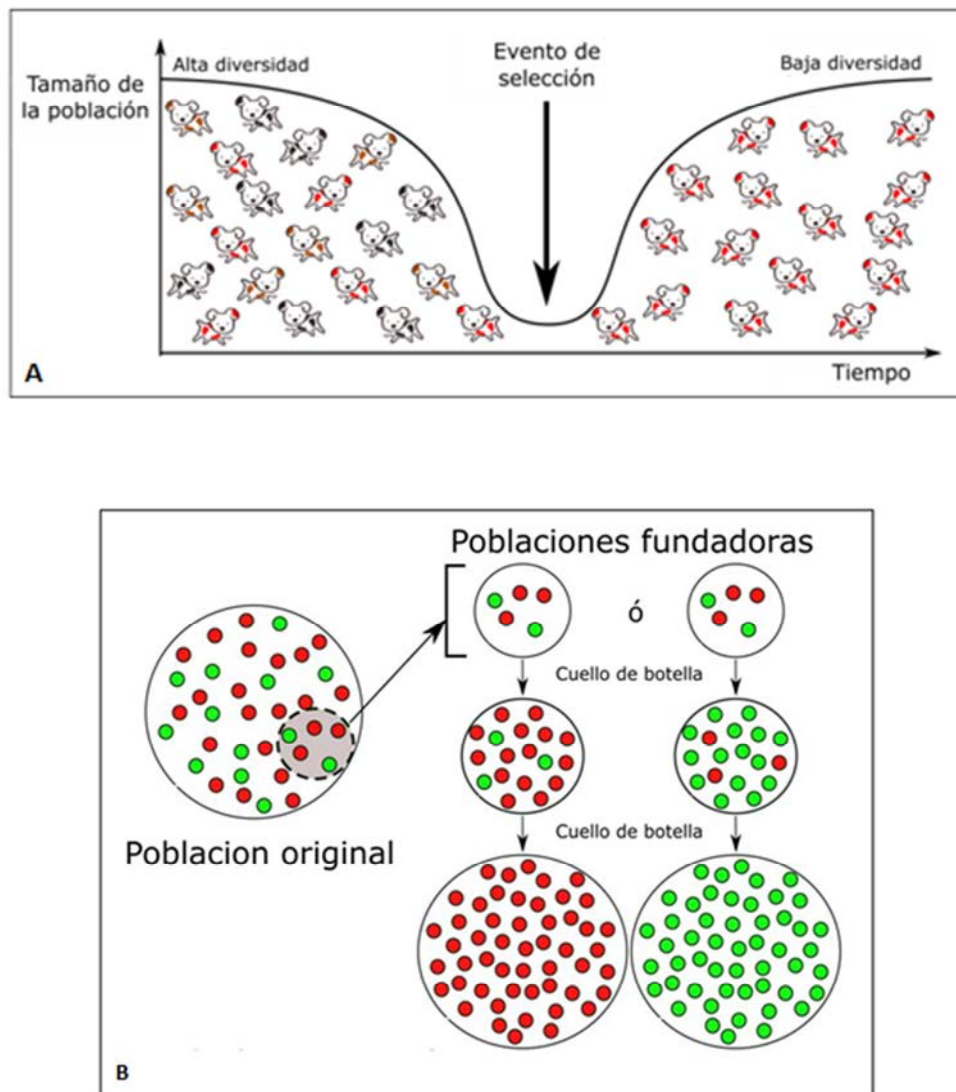


Figura 1. Representación esquemática de los fenómenos de **cuello de botella** (A) y de **efecto fundador** (B).

Diversidad Genética

La diversidad genética de las poblaciones se puede estimar mediante marcadores moleculares a través del uso de diversos índices, siendo los más utilizados la *riqueza alélica*, el *polimorfismo* y la *heterocigosidad esperada* (H_e). Por otro lado, y debido a que la diversidad genética total de una especie consta de componentes intra e interpoblacionales, se hace necesario analizar cómo se distribuye y se estructura la variabilidad genética global en y entre distintas poblaciones (Sosa y col., 2002). En este caso, podemos cuantificar y determinar el grado de diferenciación genética y la distribución de esta variación a nivel interpoblacional.

La *riqueza alélica* es el número medio de alelos por locus y cuantifica el número total de variantes detectadas en una población en cada uno de los locus analizados. Dependiendo de su historia, cada población pudo haber sufrido mayor o menor reducción en su variación genética original debido al “*efecto fundador*” o “*cuello de botella*”, fenómeno natural que afecta principalmente a aquellos alelos de más baja frecuencia (Sytsma y Schaal, 1985). A pesar de su importancia, éstos alelos no tienen mucha influencia en la medida de la heterocigosis (Zapata, 1987), así que la riqueza alélica basa su utilidad en la medición de estas reducciones de variación genética y en la detección del efecto producido por la deriva genética (Sosa y col., 2002).

De acuerdo a Hedrick (1983), la definición más útil de *polimorfismo* fue dada por Cavalli-Sforza y Bodmer (1971) quienes propusieron que “el

polimorfismo genético es la ocurrencia en la misma población de dos o más alelos en un locus, cada uno con frecuencia apreciable”. El polimorfismo o la proporción de loci polimórficos (P) es una medida del número de loci variables en una población, y se calcula dividiendo el número de loci polimórficos por el número total de loci analizados (Sosa y col., 2002). Varios autores coinciden en que es necesario el uso de un criterio arbitrario a fin de precisar el polimorfismo de un locus de acuerdo a su frecuencia alélica; ya que, cuando se aumenta en número de individuos muestreados en una población, la probabilidad de encontrar un nuevo alelo también aumenta. Este criterio suele fijarse en 95% o 99% (cuando la frecuencia del alelo más común es menor o igual que 0,95 ó 0,99, respectivamente); siendo la última opción la más utilizada, principalmente cuando el número de muestras se adecúa al 100% (Ayala, 1982; Hedrick, 1983; Fontdevila y Moya, 1999; Sosa y col., 2002).

Nei (1987) asegura que el promedio de H_e o **diversidad genética** es el método de medición más adecuado de la variación genética, pues no depende de la arbitrariedad de la definición de polimorfismo y puede ser definida sin ambigüedad en términos de frecuencias alélicas. La H_e de una población es la media de los valores obtenidos para cada locus en dicha población. Cuando las poblaciones están bajo equilibrio Hardy-Weinberg (HWE), la H_e puede ser calculada a partir de la frecuencia alélica. Por lo tanto, la H_e cuantifica la igualdad o equitatividad de las frecuencias alélicas en un locus en particular y en el promedio de los loci (Hoelzel, 1998; Sosa y col., 2002). Además, la comparación entre la heterocigosis

observada (H_o) y la H_e permite evaluar la estructura genética de las poblaciones (Nei, 1987).

Clasificación de Enfermedades genéticas caninas

Como se mencionó anteriormente, la clasificación de las enfermedades genéticas caninas se ve agravada por las barreras raciales y por el uso de unos pocos reproductores.

En la especie canina, se han clasificado a las enfermedades genéticas en **relacionadas** y **no relacionadas** directamente con el estándar racial, llegando estas últimas a un 75% del total. Esto ha sido atribuido al reducido tamaño efectivo de las poblaciones de las razas de perros, al uso repetido de reproductores populares y a los elevados niveles de consanguinidad (Ashery *col.*, 2009; Summers y *col.*, 2010).

Por lo tanto, la formación de las razas caninas ha sido asociada con el incremento de la prevalencia de un gran número de enfermedades genéticas (Björnerfeldt y *col.*, 2008). El ejemplo clásico es el síndrome braquiocefálico, que es consecuencia de la selección fenotípica en la raza Boxer y Bulldog (Packery *col.*, 2015). La alta susceptibilidad a enfermedades específicas en determinadas razas, así como su incidencia mucho menor o ausencia completa en otras razas, sugiere fuertemente la presencia de alelos de riesgo, es decir variantes alélicas que presentan una frecuencia significativamente mayor en el grupo de animales afectados que en el grupo de animales sanos. Los alelos de riesgo, si tomamos la población general, poseen una baja frecuencia, ya que si

estos fuesen variantes comunes todas las razas presentarían incidencias similares para cada enfermedad y esto no ocurre. De hecho, el 46% de las enfermedades genéticas reportadas en los perros se producen predominantemente o exclusivamente en una o en unas pocas razas relacionadas en su origen (Patterson, 2000).

Hasta la actualidad, se han reportado un total de 710 enfermedades de origen genético en caninos, de las cuales solo en 234 se conoce la mutación causal (OMIA, <http://omia.org/home/>). Sin embargo, en muchas de ellas aún no está clara o es controversial su modo de herencia. Es de destacar que por su similitud con enfermedades humanas, 412 de las enfermedades genéticas reportadas en perros son potenciales modelos para estudios de investigación (OMIA, 2017). Entre las enfermedades genéticas caninas es posible encontrar diferentes modos de herencia mendeliana o poligénica, por ejemplo:

Autosómicas recesivas: anomalía del ojo de Collie (CEA); (Pedersen y *col.*, 2004).

Autosómicas dominantes: atrofia progresiva de retina en el Mastín inglés (PARA) (Marsili y *col.*, 2015).

Ligados al cromosoma X o ligadas al sexo: distrofia muscular del Golden Retriever (GRMD) (Brinkmeyer-Langford y Komegay, 2013).

Poligénicas y multifactoriales: displasia de cadera en el Ovejero Alemán y Labrador Retriever (CHD) (Fels y *col.*, 2014).

La información codificada por los genes es tan crítica que una sola mutación puntual en el ADN puede ser suficiente para desencadenar una

enfermedad hereditaria, hacer a los individuos más o menos vulnerables a padecerla crónicamente, o ser susceptibles a contraer enfermedades infecciosas.

Origen del perro doméstico

El origen del perro doméstico es aún materia de discusión en la comunidad científica, tanto el lugar geográfico como el momento son aún controversiales. Hay estudios que sugieren que la domesticación comenzó entre 10 mil y 33 mil años atrás (Davis y Valla, 1978; Pang y *col.*, 2009; Skoglundy *col.*, 2011; Larson y Bradley, 2014; Wang y *col.*, 2015). Un estudio reciente realizado por Wang y *col.* (2015), utilizando secuencias del genoma completo de diferentes cánidos, reveló que existe una mayor diversidad genética en las poblaciones de Asia del Este comparada con las otras regiones. Estos resultados sugieren que sería en esa región geográfica donde se habría domesticado al perro 33 mil años atrás. Posteriormente, hace 15 mil años, un subgrupo migró a Oriente Medio, África y Europa. Otro de los linajes de Asia también emigró hacia el este, dando origen a una serie de poblaciones mezcladas con los linajes asiáticos endémicos (**Figura 2**).

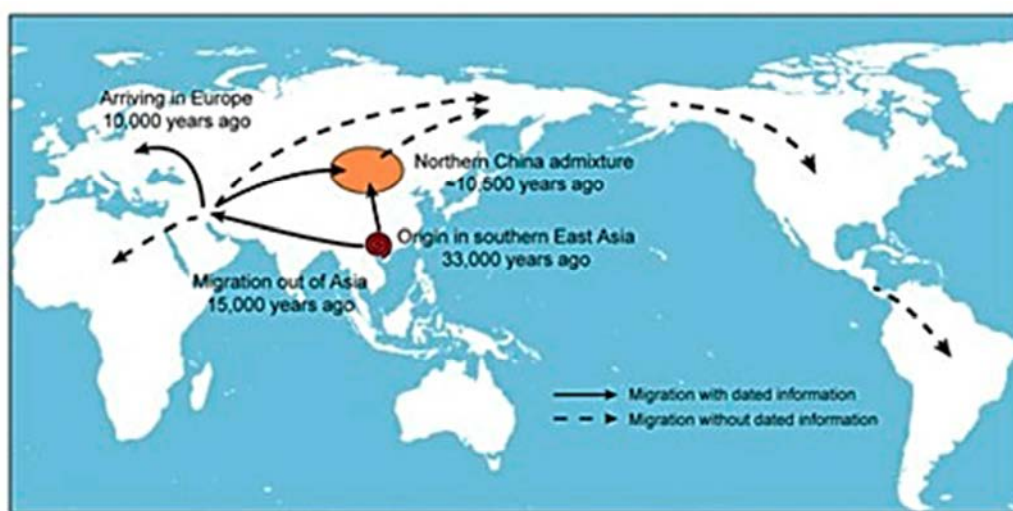


Figura 2. Centros de domesticación e historia de la migración y evolución del perro doméstico (tomado de Wang y col., 2015).

Actualmente, la población de “perros puros” está compuesta por más de 350 “islas genéticas” llamadas **razas** (Federación Cinológica Internacional; FCI; <http://www.fci.be/es/>, 2016), todas derivadas de un ancestro común, el lobo. A pesar de haber sido la primera especie domesticada, la mayoría de las razas de perros son relativamente nuevas, producto de la **intensa selección artificial** impuesta por el ser humano en los últimos 300 años (Wilcox y Walkowicz 1995; Wayne y Ostrander, 1999; Rimbault y Ostrander, 2012). Como se mencionó en la sección anterior, estas razas derivan de un pequeño número de individuos fundadores que poseían las características físicas y de comportamiento deseadas para un determinado fin. Por esta razón, muchas de las razas actuales tienen una variabilidad genética limitada con predisposición a ciertas enfermedades derivada de uno o unos pocos antecesores (**Figura 3**).

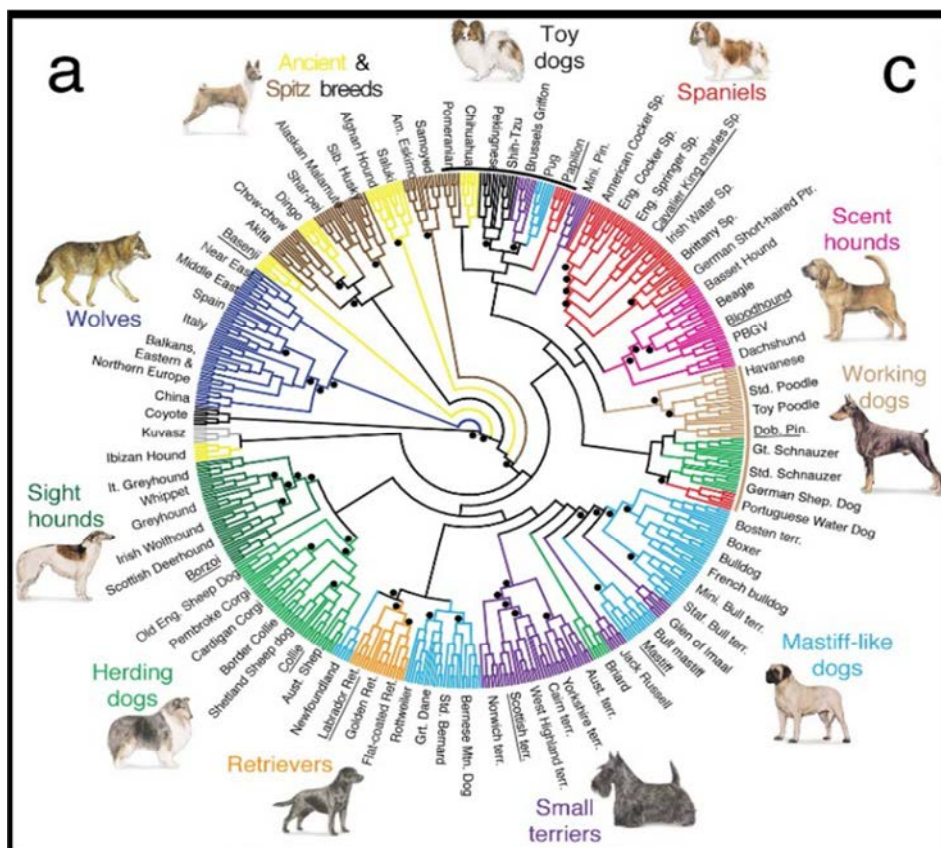


Figura 3. Árbol filogenético del perro. Cada color representa las razas morfofuncionales. Basado en datos de secuenciación masiva (Tomado de Wang y col., 2015).

Las razas caninas fueron clasificadas por la FCI en 10 grupos con características fenotípicas y usos similares (**Tabla 1**). En consecuencia también dentro de cada grupo se pueden observar enfermedades compartidas por las razas que lo componen. Así por ejemplo, la osteocondrosis se encuentra presente en las razas gigantes pertenecientes al grupo 2 (Nemanic y col., 2016).

Tabla 1. Grupos raciales de perros según la clasificación propuesta por la Federación Cinológica Internacional (FCI).

GRUPOS	RAZAS
GRUPO 1	Pastores y Boyeros (excepto Boyeros Suizos)
GRUPO 2	Pinscher y Schnauzer- Molosoides-Tipo de montaña y Boyeros suizos
GRUPO 3	Terriers
GRUPO 4	Teckels
GRUPO 5	Tipo Spitz y tipo primitivo
GRUPO 6	Tipo sabueso
GRUPO 7	Perros de muestra
GRUPO 8	Cobradores de caza- Levantadores de caza- De agua
GRUPO 9	Perros de compañía
GRUPO 10	Lebreles

Razas caninas en Argentina

Argentina es considerada a nivel mundial el país con mayor número de mascotas por habitante, el 80 % de las personas convive con algún animal de compañía. Los perros también son considerados la mascota de preferencia en el país, un 66 % de los habitantes tiene un perro (GFK group, 2016; <https://www.gfk.com/es-ar/>), y este número lleva a que Argentina se encuentre también como líder a nivel mundial en este aspecto.

Como se mencionó anteriormente, las razas están agrupadas por aspectos fenotípicos y usos. En Argentina se registran anualmente cachorros de aproximadamente 110 razas, y el número de inscriptos por año varía de acuerdo a la exposición que haya mantenido esa raza en el último tiempo. En la **tabla 2** se muestra el registro de perros inscriptos durante los años 2016 y 2017 por la FCI.

Tabla 2. Número de animales inscriptos por raza, por la Federación Cinológica Argentina, durante los años 2016 y 2017.

Cod. Raza	Nombre de la raza	Inscr. anual		Cod. Raza	Nombre de la raza	Inscr. anual	
		2016	2017			2016	2017
AFGH	AFGHAN HOUND	45	19	JRTE	JACK RUSSELL TERRIER	1417	1333
AIRE	AIREDALE TERRIER	84	44	KEBT	KERRY BLUE TERRIER	10	5
AKIN	AKITA INU	376	380	KOMO	KOMONDOR	0	5
ASTE	AM. STAFFORDSHIRE TERRIER	333	298	KURZ	DEUTSCH KURZHAAR	175	236
AUCA	AUSTRALIAN CATTLE DOG	2	40	KUVA	KUVASZ	40	17
AUSH	AUSTRALIAN SHEPHERD	19	15	LAAP	LHASA APSO	16	10
BAHO	BASSET HOUND	145	100	LARE	LABRADOR RETRIEVER	1080	761
BASE	BASENJI	4	11	MAGY	MAGYAR VIZSLA PELO DURO	0	8
BEAG	BEAGLE	1696	1499	MALT	MALTES	729	639
BEBR	BERGER DE BRIE	15	3	MANA	MASTIN NAPOLITANO	139	173
BECO	BEARDED COLLIE	54	53	MAST	MASTIFF	105	68
BESE	BOYERO DE MONTAÑA BER.	1039	947	MATI	MASTIN TIBETANO	5	2
BIFR	BICHON FRISE	935	614	MAVI	MAGYAR VIZSLA PELO CORTO	371	278
BIHA	BICHON HABANERO	126	83	OESD	OLD ENGLISH SHEEPDOG	10	24
BLOO	BLOODHOUND	14	11	OVBE	OVEJERO BELGA	432	405
BOCO	BORDER COLLIE	709	568	PAMA	PAST.MAREMMANO-ABRUZZESE	5	4
BORD	BORDER TERRIER	9	19	PAPI	EPAGNEUL NAIN CONTINENTAL	0	4
BORI	BOERBOEL	4	23	PBGV	PETIT BASSET GRIFFON VENDEEN	6	4
BORZ	BORZOI	49	55	PBSU	PASTOR BLANCO SUIZO	387	305
BOTE	BOSTON TERRIER	342	319	PEAG	PERRO DE AGUA ESPAÑOL	35	45
BOXE	BOXER	544	517	PEBR	PEQUEÑO BRABANZON	0	2
BUDI	BULLDOG INGLES	3507	3221	PECA	PERRO DE PASTOR DEL CAUCASO	35	60
BUFR	BULLDOG FRANCES	13652	14842	PEKI	PEKINES	33	15
BUMA	BULLMASTIFF	535	500	PHAR	PHARAOH HOUND	8	8
BUTE	BULL TERRIER	1439	1449	PINS	PINSCHER MINIATURA	153	98
CACO	CANE CORSO	926	943	PITI	AMERICAN PIT BULL TERRIER	657	417
CAKC	CAVALIER KING CHARLES SP.	15	16	POIN	POINTER	334	320
CANI	CANICHE	1335	899	POME	DEUTSCHER SPITZ - ZWERGSPITZ	317	324
CATE	CAIRN TERRIER	26	29	PPRU	PEQUEÑO PERRO RUSO	0	5
CHCR	CHINESE CRESTED DOG	31	45	PUG	PUG	2255	1956
CHIH	CHIHUAHUA	2110	1967	RHRI	RHODESIAN RIDGEBACK	152	221
CHOW	CHOW CHOW	113	130	ROTT	ROTTWEILER	1068	929
CHRE	CHESAPEAKE BAY RETRIEVER	0	8	SABE	SAN BERNARDO	41	14
COLL	COLLIE ROUGH	178	138	SALU	SALUKI	4	14
COSA	COCKER SPANIEL AMERICANO	41	33	SAMO	SAMOYEDO	43	57
COSI	COCKER SPANIEL INGLES	41	22	SCGI	SCHNAUZER GIGANTE	350	309
COTU	COTON DE TULEAR	22	19	SCMI	SCHNAUZER MINIATURA	2120	1637
DACH	DACHSHUND	727	634	SCST	SCHNAUZER STANDARD	42	54

DALM	DALMATA	20	30	SCTE	SCOTTISH TERRIER	174	105
DESP	DEUTSCHER SPITZ	24	18	SEIN	SETTER INGLES	105	27
DOBE	DOBERMANN	472	527	SEIR	SETTER IRLANDES	13	21
DOBO	DOGO DE BORDEAUX	1321	1361	SHIB	SHIBA INU	127	149
DOCA	DOGO CANARIO	59	67	SHPE	SHAR PEI	1343	1123
DOGO	DOGO ARGENTINO	1677	1767	SHSH	SHETLAND SHEEPDOG	50	38
DRAH	DEUTSCH DRAHTHAAR	0	18	SHTZ	SHIH TZU	337	299
ENSP	ENGLISH SPRINGER SPANIEL	24	9	SIHU	SIBERIAN HUSKY	66	91
EPBR	EPAGNEUL BRETON	232	144	STBT	STAFFORDSHIRE BULL TERRIER	184	241
FILA	FILA BRASILEIRO	355	321	TERR	TERRANOVA	245	215
FOS	FOX TERRIER SMOOTH	71	105	WEIM	WEIMARANER	155	55
FOW	FOX TERRIER WIRE	84	56	WEPE	WELSH CORGI PEMBROKE	46	63
GORE	GOLDEN RETRIEVER	1467	1030	WETE	WELSH TERRIER	12	18
GPJA	AKITA AMERICANO	33	32	WHIP	WHIPPET	50	45
GRDA	GRAN DANES	255	251	WHWT	WEST HIGHLAND WHITE TERRIER	543	365
GRIF	GRIFFON DE BRUSELAS	1	2	YOTE	YORKSHIRE TERRIER	1284	849
IRWH	IRISH WOLFHOUND	19	12	OVAL	OVEJERO ALEMAN	7381	6834
ITGR	ITALIAN GREYHOUND	19	15				

*Se citan sombreadas en gris a las razas que forman parte de este trabajo.

Importancia de la producción canina en la Argentina

Cuando se habla de producción animal en nuestro país, en general no se tiene en cuenta a la cría de perros de raza pura como parte de esta actividad económica. La cría y posterior venta de cachorros es llevada a cabo por pequeñas y medianas empresas (PyME), en la mayoría de los casos con bajo asesoramiento en cuanto a los programas de cruzamientos y mejora. Podría decirse que en Argentina constituye un negocio muy heterogéneo. Sin embargo, a nivel nacional, y en relación a la comercialización de animales vivos, es la actividad que tiene más mercados abiertos. Así por ejemplo, durante el año 2017 se exportaron perros a 46 países (SENASA, 2018; www.senasa.gob.ar).

El perro como modelo experimental para el estudio de enfermedades humanas

Los perros forman una parte importante de la historia de la investigación. Desde el siglo XVII, cuando empezó a acelerarse la comprensión de la fisiología, hasta los tiempos modernos, mientras progresamos hacia la era de la genética, los perros han desempeñado un papel vital en el aumento del conocimiento y en el desarrollo de nuevos tratamientos para un amplio número de enfermedades (<http://www.animalresearch.info/es/el-diseno-de-la-investigacion/animales-de-investigacion/los-perros/>).

El uso de perros como modelos para las enfermedades humanas ha demostrado ser increíblemente útil. Ellos comparten gran parte de nuestro

ADN, viven en ambientes similares, y comparten muchas de las enfermedades con el humano. Además, debido a que han sido criados con cuidado, la cartografía de las enfermedades a través de su árbol genético es más fácil de lo que es en los seres humanos.

Por ejemplo, en 1880 Louis Pasteur desarrolló una vacuna contra la rabia canina, mediante el uso de perros infectados con el virus de campo o salvaje (virus de calle). El investigador inyectó el tejido nervioso infectado en cerebros de perros sanos y reprodujo la enfermedad. Por otro lado, mediante la inoculación intracerebral de conejos con “virus de calle” y el secado del tejido nervioso de los conejos infectados, logró que el virus perdiera su patogenicidad y conservara la capacidad inmunizante sentando las bases para la producción de vacunas.

La distrofia muscular de Duchenne es la forma de distrofia muscular más frecuente y afecta a 1 de cada 3.500 niños. El único modelo animal que reproduce la patología humana y los mecanismos bioquímicos es el perro de raza Golden Retriever. Sampaolesi y colaboradores (2006) tomaron células madre de estos perros y corrigieron el gen mutado antes de inyectarlo de nuevo en el tejido muscular de otros perros. Al desarrollarse nuevas fibras musculares a partir de estas células lograron restablecer el nivel de funcionamiento de los músculos.

Los sistemas de cría en los perros, en su mayoría son muy endogámicos y como consecuencia de esto, los animales de una misma raza son genéticamente similares. Esto ha facilitado la búsqueda de una mutación para una enfermedad específica, hallar los genes que presentan

estas mutaciones a partir de unos pocos animales sanos y enfermos y determinar su modelo de herencia con solo analizar los pedigrís en periodos relativamente cortos de tiempo. En humanos esto llevaría miles de pacientes y voluntarios controles, además de muchos años.

En 2005, el equipo de Lindblad-Toh analizó todos los genes de una perra bóxer llamada Tasha para producir una secuencia genética extremadamente precisa. Este y otros trabajos han demostrado que la secuencia genética de perros como Tasha es muy parecida a la de los humanos, lo que significaría que muchos de los genes que causan una enfermedad en perros también podrían estar detrás de la manifestación de un trastorno similar en humanos (Lindblad-Toh y *col.*, 2005).

DEGENERACIÓN PROGRESIVA DE CONOS Y BASTONES (PRCD)

Cuando nos enfrentamos a la patología del fondo ocular, son muchos los factores que debemos considerar. Así como algunas afecciones retinianas pueden tener un componente hereditario, otras enfermedades del fondo ocular como las retinopatías, coriorretinitis y neuritis ópticas pueden tener relación con problemas sistémicos (infecciosos o metabólicos). Por este motivo, es fundamental conocer la anatomía y la fisiopatología de dichas estructuras para poder detectar cualquier anomalía. En muchas ocasiones, una lesión oftalmológica en el fondo ocular es el único síntoma de una enfermedad sistémica. El simple hecho de incluir un examen oftalmoscópico básico en las revisiones rutinarias de los pacientes nos permitirá una detección precoz de muchas afecciones.

Entre las enfermedades retinianas podemos mencionar:

Degeneración retiniana adquirida súbita (SARD): es un desorden retiniano que desencadena una ceguera permanente, que se desarrolla de forma repentina. Su etiología en estos momentos es desconocida. Meses después de instaurarse la enfermedad comienzan a aparecer signos de degeneración retiniana, hiperreflectividad tapetal, adelgazamiento de los vasos y palidez de la papila óptica. Esto puede tener lugar en perros de cualquier raza, sexo y edad.

Hemorragias retinianas: la acumulación de sangre entre las distintas capas de la retina provoca un desprendimiento, por lo que es habitual encontrar estos dos hallazgos al mismo tiempo. Entre todas las posibles causas de hemorragia retiniana, la hipertensión arterial sistémica (HAS)

se destaca por su protagonismo y es la responsable de numerosos casos de ceguera en pacientes geriátricos. Se presenta tanto en la especie felina como en la especie canina, aunque cobra mayor importancia en pacientes geriátricos felinos con insuficiencia renal crónica.

Desprendimiento retiniano (DR): se denomina desprendimiento retiniano (DR) a la separación de la neuroretina del epitelio pigmentario subyacente. Al romperse la unión entre estas dos capas los nutrientes no pueden llegar desde las coroides a la neuroretina y tampoco se pueden eliminar los productos de desecho de la misma. Debido al gran metabolismo retiniano rápidamente se producen grandes daños causando una ceguera irreversible. Puede darse como producto de un orificio en la retina y un posterior desplazamiento del vítreo que provoca el ingreso de líquido en el espacio subretiniano (regmatógeno) o también cuando el epitelio pigmentario deja pasar líquido que se acumula entre este y el espacio de fotorreceptores.

Coriorretinitis: es una inflamación de la coroides (úvea posterior) que provoca secundariamente una inflamación de la retina. Este estado es normalmente secundario a una enfermedad sistémica. Existen múltiples etiologías que pueden desencadenar una coriorretinitis, tanto en el perro como en el gato. En la fase activa se pueden ver lesiones unilaterales o bilaterales, asimétricas, redondeadas de color blanquecino debido al infiltrado inflamatorio. Asimismo, se observa edema y hemorragias que pueden llegar a desencadenar un desprendimiento retiniano.

Enfermedades retinianas congénitas:

Displasia de retina: La displasia retiniana es una afección congénita que se caracteriza por una alteración del desarrollo de las distintas capas de la retina. Este defecto da lugar a la formación de pliegues retinianos, rosetas o áreas lesionadas más o menos grandes. En función de la extensión de las lesiones se pueden distinguir dos tipos de displasia: focal o multifocal y geográfica. La Displasia focal o multifocal presenta una o varias zonas lineales o redondeadas de hiperreflectividad, normalmente localizadas en la zona tapetal. Cuando se localizan en la zona no tapetal presentan un color blanquecino o grisáceo. La visión en estos casos es normal. La Displasia geográfica consiste en la presentación de áreas de gran tamaño con forma irregular en la zona tapetal rodeadas de un halo hiperreflectante. Dependiendo del tamaño de la lesión la visión puede estar alterada. Es frecuente observar desprendimiento retiniano asociado.

Anomalía del ojo del Collie (AOC): Es un desorden ocular congénito y hereditario que afecta al segmento posterior, con una variedad en la presentación de los signos y en su manifestación. La AOC se caracteriza por un defecto en el desarrollo de las estructuras mesodérmicas, vasculares y fibrosas del segmento posterior. Los dos cambios más importantes son hipoplasia coroidea y coloboma de la papila del nervio óptico. Otros cambios que pueden presentarse son desprendimiento retiniano y hemorragia intraocular (Esteban y col., 2013)

Atrofia Progresiva de Retina (APR): Dentro de las disfunciones visuales o “cegueras” que son motivo de consultas en la clínica de pequeños animales, las enfermedades de retina tienen categoría con entidad propia. De todas ellas se destaca la **APR** (Villagrasa, 1992), que constituye un grupo muy heterogéneo de degeneraciones retinianas en el perro. Algunas ocurren muy tempranamente y otras más tarde en la vida del individuo, y pueden tener herencia recesiva, dominante o ligadas al cromosoma X. Sin embargo, todas estas enfermedades muestran signos fenotípicos muy similares a los de la Retinitis pigmentosa en humanos, teniendo en común la degeneración de los bastones en primera medida, y posteriormente, de los conos (Palanova, 2016).

Atrofia Progresiva de Retina:

En animales jóvenes o estadios muy iniciales de la enfermedad, es complicado de diagnosticar si no se observan signos de degeneración retinal, por lo que la oftalmoscopia no es suficiente. Por lo tanto, es necesario recurrir a electroretinografía (ERG) para detectar enfermedades retinianas que por ser muy incipientes no se detectan mediante oftalmoscopia. La ERG registra la actividad eléctrica de la retina tras un estímulo luminoso, es decir que es un procedimiento objetivo que valora la funcionalidad de la retina. La ERG no es una medida de la visión, sino de la integridad funcional de la retina, ya que tiene la finalidad de analizar la función de las dos primeras capas de la misma (el epitelio pigmentado y la capa de fotorreceptores). En función al número de fotorreceptores puestos en actividad y a la superficie retiniana funcional,

obtenemos distintas respuestas. Toda alteración de la transparencia de los medios anteriores del globo ocular (córnea, cámara anterior, cámara posterior, cristalino, membrana hialoidea, vítreo), puede modificar el resultado de la ERG. En la retina encontramos distintos tipos de fotorreceptores, entre los que se encuentran:

- **Conos:** responsables de la visión diurna, y que necesitan bastante luz para su funcionamiento. Estas células discriminan mejor la visión fina que los bastones y son los responsables de la diferenciación de los colores.
- **Bastones:** son los responsables de la visión nocturna, y funcionan con muy poca luz. Aunque estas células son muy sensibles tienen escasa discriminación visual. Hay animales nocturnos que sólo tienen bastones.

Dependiendo de los fotorreceptores que se afecten se observa:

- Bastones: los animales pierden visión nocturna (nictalopía).
- Conos: los animales pierden visión diurna (hemeralopía).
- Ambos a la vez: pérdida de visión sin afectar la luminosidad.

El que se afecten unos u otros fotorreceptores depende de la raza, al igual que la edad de presentación. Las **APR** son aquellas que aparecen de forma paulatina y tienen una sintomatología típica dependiente de la raza (afección de fotorreceptores). Entre los signos típicos de **APR** se pueden mencionar:

- *Pérdida visual:* normalmente aparece primero una ceguera nocturna (hemeralopía), porque se suelen afectar inicialmente los bastones, y posteriormente, se desarrolla la ceguera diurna (nictalopía), cuando avanza el proceso y se afectan los conos. Aparece además dificultad

para ver objetos en movimiento. La afección de unos u otros fotorreceptores depende de la raza y el tipo de atrofia. La aparición de la ceguera completa no se puede predecir, pero mientras más joven es el animal más rápido progresa la enfermedad.

- *Pupila dilatada*: no responden correctamente a la luz. Los animales presentan un reflejo de color amarillo, verdoso o anaranjado típico debido a la hiperreflexia retinal (brilla más de lo normal) y la midriasis (dilatación pupilar).

- *Aparición de cataratas*: secundarias a la degeneración retinal y son causadas por sustancias liberadas por la retina dañada. Los síntomas de la enfermedad son los mismos para todas las razas: en una primera fase los perros tienen dificultad para ver por la noche y pierden la habilidad de ajustar su visión, y después su visión diurna. Las pupilas se van dilatando progresivamente y los ojos aparecen nublados u opacos originando como consecuencia una catarata (Narfström y col. 2002). Este tipo de atrofia de retina se describió en principio en caniches. Desde entonces, las distintas variantes fenotípicas de la enfermedad se han observado en diferentes razas, edad, etc. (WeiKuan, 1999). La aparición de la ceguera completa no se puede predecir pero cuanto más joven es el perro más rápido progresa la enfermedad.

Entre las **APR** más conocidas están la Displasia de Conos y Bastones tipo I y tipo II, APR Generalizada del Lebel Árabe, APR tipo I en Golden Retriever, APR Ligada al X y la **Degeneración Progresiva de Conos y Bastones (PRCD)**.

Degeneración Progresiva de Conos y Bastones (PRCD)

Es el trastorno de retina con más prevalencia en perros entre las varias y diferentes enfermedades hereditarias con manifestación clínica y colectivamente reconocidas dentro de las atrofas de retina. Hasta el momento, esta enfermedad se ha reportado en más de 29 razas de perros (Kohyama y col. 2016), entre las que se encuentran los Labradores Retrievers, Caniches Toy, Caniche Toy Miniatura, Cocker Spaniel, Golden Retriever, Perro de agua portugués y Pastor australiano.

En los animales con **PRCD** primero se atrofian los bastones, por lo que entre las primeras señales de la enfermedad se ve hemeralopía. El empeoramiento de la vista del perro con la penumbra suele ser el primer signo detectado por los criadores. El perro se orienta con dificultades y choca con obstáculos; su pupila se mantiene ampliamente abierta incluso con luz proyectada directamente al ojo (el ojo del perro brilla enormemente cuando se fotografía) y se empeora su vista periférica. Más tarde empiezan a degenerarse también los conos de la retina. La última fase de la enfermedad es la formación de cataratas y la pérdida total de la vista. El defecto surge sólo tras el desarrollo normal de los fotorreceptores. La degeneración no se desenvuelve en toda la retina de manera igual. La parte inferior de la retina se afecta antes y con mayor intensidad, aunque no es obvio al examinarla con oftalmoscopio.

Métodos de estudio y diagnóstico

La enfermedad PRCD se puede diagnosticar clínicamente durante la adolescencia del perro. EL diagnóstico del PRCD por ERG o por oftalmoscopia es relativamente complicado por varias razones:

- existen varios tipos de defectos de la vista del perro.
- la enfermedad puede desarrollarse a distintas edades de los perros.
- la gravedad de la enfermedad difiere según la raza.

Si las afecciones retinianas son de tipo displásica, el ERG nos permite detectar los perros afectados en las primeras semanas de vida, porque los fotorreceptores tienen los potenciales alterados. Sin embargo oftalmoscópicamente no hay alteración hasta el año de edad.

En la forma degenerativa, la dificultad diagnóstica es mayor, porque los fotorreceptores en el momento del nacimiento, tienen un potencial normal en el ERG, no pudiéndose apreciar anomalías hasta al menos 1-3 años, en la mayoría de las razas, mientras que las alteraciones funcionales y oftalmoscópicas no se evidencian hasta los 3-5 años de edad media (Villagrasa,1992).

Se han reportado caracterizaciones histopatológicas detalladas de **APR** canino, generalmente en criaderos, permitiendo realizar exámenes a lo largo de varios puntos en el tiempo durante la progresión de la enfermedad. Además, se han realizado investigaciones electrofisiológicas en ambientes controlados para evaluar el proceso patológico en curso.

La mayoría de los estudios electroretinográficos se han realizado en vivo. Sin embargo, el estudio de la retina aislada es lo que hasta el momento ha producido mayor información.

En algunas razas se han realizado análisis bioquímicos de las retinas afectadas. En ciertos casos de **APR**, se encontró anormal y elevado nivel de cGMP (Guanosín Monofosfato cíclico) previo al comienzo de la degeneración retiniana, lo que sugiere una avería en la cascada de transducción visual. El cGMP es el metabolito final y se acumula cuando la cascada no funciona con normalidad.

Las mutaciones del gen de la subunidad cGMP-PDE13 han demostrado también ser los responsables de los niveles elevados de cGMP. En la distrofia retinal resultante en la degeneración de la retina en el ratón (Bowes y col., 1990), displasia de conos y bastones tipo 1 en el Setter Irlandés (Suber y col., 1993; Clements y col., 1993) y en la distrofia fotorreceptora de Labradores retrievers de Escandinavia (Kommonen y col., 1996; Petersen-Jones, 1998).

La mutación genética asociada a un elevado nivel de cGMP que genera otra forma de **APR** (Displasia de Conos y Bastones tipo 2) en el Collie, se ha demostrado que no se corresponde con el defecto encontrado en la raza Setter.

Algunos de los métodos moleculares de diagnóstico temprano que se utilizan hoy en día se basan en la detección de la mutación por PCR-RFLP (Dostal, 2011), secuenciación, PCR Real Time (Gentili, 2009;

Kohyama, 2015), pyrosecuenciación (Zangerl, 2006), y métodos basados en NGS (New Generation Sequencing).

Genética y Herencia

La PRCD tiene una herencia de tipo autosómica recesiva, y ha sido reportada hasta la fecha en más de 29 razas. El locus del gen PRCD (DQ390330) está localizado en el extremo centromérico del cromosoma canino 9 (Sidjanin, 2003), el cual codifica para una proteína de 54 aminoácidos. La mutación causal de la PRCD es un cambio de nucleótido simple (SNP), una transición de G por A (**G1298A**), que ocasiona un cambio de una cisteína por una tirosina (Cys2Tyr) (Zangerl y *col.*, 2006; Kohyama y *col.* 2015). De modo que un perro puede encontrarse bajo tres condiciones:

1) estar libre de la enfermedad (genotipo PRCD/PRCD u homocigoto normal), significando que no es portador de la mutación y que no desarrollará la forma PRCD de PRA. Teniendo en cuenta que no puede transmitir la mutación a su descendencia, este animal puede ser cruzado con otro animal.

2) presentar una copia del gen PRCD con la mutación (genotipo PRCD/prcd o heterocigota), en cuyo caso es denominado portador. Aunque estos perros no van a estar afectados por la enfermedad PRCD-PRA, pueden transmitir la mutación a su descendencia, y es por ello que estos animales deben ser cruzados sólo con otros certificados libres de la enfermedad (PRCD/PRCD).

3) presentar dos copias del gen PRCD con la mutación (genotipo *prcd/prcd* o afectados homocigotos). Ellos siempre transmiten el gen mutado a toda la descendencia, y es por ello que estos animales deben ser utilizados para servicio sólo con perros que posean certificado libre de la enfermedad (PRCD/PRCD) (Laboklin, 2007).

PRCD en el mundo

Como se ha mencionado anteriormente, esta enfermedad es una de las más comunes de las afecciones oculares presentes en la mayoría de las razas de perros, aunque la frecuencia de la mutación varía tanto entre las distintas razas como entre los diferentes países. Dostal (2011) publicó la frecuencia de la mutación G1298A en diferentes razas en la República Checa (**Tabla 3**). Kohyama (2015) realizaron un estudio similar en Japón en las razas Chihuahua, Caniche Toy y Duchshund miniatura (**Tabla 4**).

Tabla 3. Frecuencias alélicas y genotípicas relacionadas a PRCD en diferentes razas en la Republica Checa (Dostal y col. 2011). PRCD: alelo normal; prcd: alelo mutado.

Raza	n	Frecuencias genotípicas			Frecuencias alélicas	
		sanos PRCD/PRCD	portadores PRCD/prcd	afectados prcd/prcd	PRCD	prcd
Cocker spaniel americano	55	46	8	1	0,91	0,09
Cocker spaniel ingles	135	61	58	16	0,66	0,34
Springer spaniel ingles	18	18	0	0	1,00	0,00
Springer spaniel gales	11	11	0	0	1,00	0,00
Retriever de pelo liso	25	25	0	0	1,00	0,00
Golden Retriever	57	57	0	0	1,00	0,00
Retriever de Cheaspeake	7	5	2	0	0,86	0,14
Retriever de Nva. Escocia	44	14	21	9	0,56	0,44
Labrador Retriever	8	51	6	1	0,93	0,07
Caniche Toy	59	23	19	17	0,55	0,45
Caniche Miniatura	65	43	18	4	0,80	0,20
Caniche Mediano	21	19	2	0	0,95	0,05
Caniche Estándar	4	4	0	0	1,00	0,00
Perro de agua portugues	3	1	2	0	0,66	0,33
Crestado chino	99	96	3	0	0,98	0,02
Schipperke	8	7	1	0	0,94	0,06
Pastor australiano	33	33	0	0	1,00	0,00
Total	702	514	140	48		

Tabla 4. Frecuencia de alelo mutado (prcd) y de animales portadores y afectados en perros de la raza Caniche Toy, Chihuahua y Dachshund miniatura. (Kohyama et al. 2015)

Raza	n	N° portadores (%)	N° de afectados (%)	Frecuencia prcd	Intervalo de confianza del 95% de de la frecuencia de prcd
Caniche Toy	200	33(16,5)	1(0,5)	0,088	0,062-0,120
Chihuahua	54	2(3,7)	0(0)	0,019	0,002-0,065
Dachshund miniatura	100	0(0)	0(0)	0	ND

En los casos anteriores se puede ver que en Japón la frecuencia reportada para el alelo mutado en Caniches Toy es de 0,088 (Kohyama, 2015) mientras que en la República Checa es de 0,45 (Dostal, 2011) para la misma raza. El estudio realizado por Galian (2006) para la raza Labrador retriever mostró una frecuencia del alelo mutado de 0,014, mientras que el mismo autor en 2012 publicó una frecuencia alélica de la mutación de 0,15.

Antecedentes en Argentina

Actualmente, son muy pocos los datos que existen sobre esta enfermedad en nuestro país, si bien existen laboratorios que realizan el test para PRCD. Bernardes (2014) expone un trabajo realizado entre consultorios privados, la Universidad de Buenos Aires y La sociedad rural Argentina en un Congreso de la Asociación de Veterinarios especializados en animales de compañía de Argentina (AVEACA), donde relaciona los signos oftalmológicos y la mutación, en perros de raza Cocker Spaniel y Caniche Toy, mostrando estos últimos una frecuencia alélica para el gen mutado de 0,6.

ENFERMEDAD DE VON
WILLEBRAND TIPO 1 (EvW 1)

Las patologías asociadas al torrente sanguíneo, son afecciones que se presentan con frecuencia en los perros, y muchas veces con características similares a enfermedades humanas. Algunas son de carácter más leve y otras que pueden llegar a comprometer la salud del animal. Sin embargo, todas requieren de diagnósticos tempranos y tratamientos específicos.

Las plaquetas son la primera línea de defensa para prevenir la pérdida de sangre debido a una lesión vascular. Una función plaquetaria anormal puede dar como resultado un sangrado de tipo plaquetario, típicamente caracterizado por hemorragia mucocutánea.

El sangrado excesivo durante la erupción de los dientes permanentes es un signo clínico clásico en perros afectados. Las hemorragias espontáneas en adultos jóvenes y en animales más viejos son generalmente de naturaleza leve o insidiosa aunque con el tiempo puede asociarse con el desarrollo de anemia por deficiencia de hierro.

Las hemorragias agudas y potencialmente mortales pueden ocurrir producto de traumas o durante cirugías, inclusive en la médula espinal o en el cerebro, manifestándose como parálisis o convulsiones.

Una combinación de disfunciones plaquetarias con trombocitopenia puede provocar hemorragias graves (Bourdreaux, 2012). Los trastornos hereditarios de las plaquetas se pueden dividir en 2 grandes categorías:

- Trastornos extrínsecos.
- Trastornos intrínsecos.

Los trastornos **extrínsecos** de las plaquetas son trastornos en el cual las plaquetas son normales pero una proteína necesaria para su función está ausente, está en bajo número o no es funcional. El tipo más común de este tipo de trastornos es la enfermedad de von Willebrand (EVW). Para la agregación plaquetaria normal se requiere fibrinógeno, la hipofibrinogenemia y la disfibrinogenemia, pueden conducir a un trastorno plaquetario extrínseco. Estos dos últimos, son mucho más raros que la enfermedad de EvW.

Los trastornos **intrínsecos** involucran directamente a las plaquetas, pueden surgir de anomalías en gránulos de plaquetas, de las glicoproteínas de membrana, de la transducción de proteínas de señal o de proteínas involucradas en la producción de plaquetas de megacariocitos.

Varios trastornos intrínsecos se han descrito en animales, como la Trombastenia de Glanzmann y la Anomalía P2Y12 (Deficiencia selectiva de las plaquetas a la adenosín di fosfato).

En el campo de las coagulopatías hereditarias caninas, son importantes dos trastornos de la hemostasia en los que siempre es conveniente la intervención eugenésica acordada entre criadores, propietarios e investigadores. Estamos hablando de la Enfermedad de von Willebrand (**EvW**) y de la Hemofilia A. Además de estas dos enfermedades existen una serie de otras patologías de la coagulación, y más extensamente del sistema hematopoyético, cuya naturaleza genética

y hereditaria se ha comprobado y que también son necesarias considerar en la práctica de cría diaria (Lubas y col., 2010).

Los modelos animales de trastornos hemorrágicos hereditarios proporcionan información preclínica esencial, la que es crítica para la seguridad y traducción exitosa de los avances científicos a los humanos con trastornos análogos. Los modelos animales disponibles han sido revisados por otros autores (Lozier y col. 2013).

Durante las últimas siete décadas, los avances en la comprensión de las causas moleculares de trastornos hereditarios de la coagulación en humanos y perros han ido avanzando notablemente en paralelo y en forma complementaria con respecto al desarrollo de ensayos básicos para los factores antihemofílicos (AHF: FVIII y FIX), factor von Willebrand (**vWF**), FVII y glicoproteínas de membrana de plaquetas, así como, en la producción de derivados del plasma, terapias alternativas de reemplazo de proteínas, etc (Nichols, 2016).

Estos datos también proporcionan una base sólida para una terapia génica segura y efectiva para trastornos hereditarios de la coagulación en ambas especies. Nichols (2016) en su artículo sobre “El perro como modelo de estudio de coagulopatías hereditarias” realiza una cronología de los estudios preclínicos en perros con trastornos hereditarios de la coagulación desde la década de 1940 hasta la actualidad, así como también de terapias de reemplazo de proteínas (recombinantes y wild-type), terapia génica, etc. (**Figura 4**).

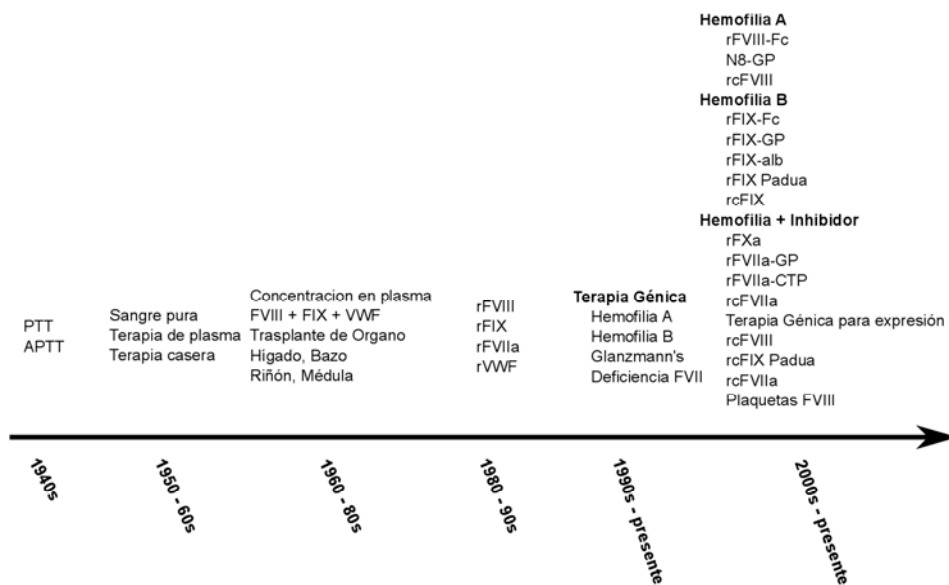


Figura 4. Cronología de los estudios preclínicos en perros con trastornos hereditarios de la coagulación .PTT, tiempo de tromboplastina parcial; APTT, tiempo de tromboplastina parcial activada; 'R' indica recombinante; 'C' indica origen canino; FVIII, factor VIII; FIX, factor IX; FVIIa, factor VIIa; '-Fc' indica proteína de fusión Fc; 'GP' indica glicopegilación; '-alb' indica albúmina fusión; y '-CTP' indica la fusión del péptido C terminal de hCG. (Tomado de Nichols, 2016)

Factor de Coagulación de von Willebrand (vWF)

El vWF es una glicoproteína multimérica que consiste en una serie de subunidades diméricas unidas por enlaces disulfuro (Ruggeri y *col.*, 1981). La masa molecular del vWF varía entre 500.000 para el dímero y 15×10^6 Da para los multímeros grandes. El vWF es sintetizado por células endoteliales y megacariocitos. El derivado de los megacariocitos se almacena en los α -gránulos de las plaquetas, mientras que los derivados de las células endoteliales se liberan constitutivamente en el plasma o son almacenados en organelas especializadas llamadas cuerpos de Weibel-Palade (Wagner y *col.*, 1990). Esta proteína actúa como un nexo molecular entre las plaquetas y el subendotelio, tiene tres grandes regiones funcionales: una región de unión con el colágeno, otra de unión con las plaquetas y una última región de interacción con el factor VIII (Denis y *col.*, 2003; Duggan y *col.*, 1987; Marder y *col.*, 1985). Al actuar como portador del factor VIII, provee estabilidad en la circulación frente a la degradación relacionada a proteasas. Algunas caracterizaciones bioquímicas e inmunológicas han revelado que el vWF y el Factor VIII (en su ausencia ocasiona Hemofilia A), son productos de genes distintos, y sus niveles anormales de calidad y cantidad, generan enfermedades diferentes (Wagner y *col.*, 1990).

La enfermedad de von Willebrand (EvW)

La **EvW**, como se mencionó anteriormente, es el desorden hereditario extrínseco de plaquetas más común encontrado entre las coagulopatías en perros. Fue descrita por primera vez en humanos en 1926 por Erik von Willebrand, y se distinguió de la Hemofilia A por tener una herencia recesiva ligada al cromosoma x (von Willebrand y *col.*, 1926, von Willebrand y *col.*, 1930).

En perros, esta enfermedad está estrechamente asociada a la raza Doberman. Sin embargo, fue identificada en otras 54 razas. El primer reporte se publicó en 1970 en una familia de Ovejeros Alemán, con signos clínicos muy parecidos a la enfermedad en humanos (Brooks y *col.*, 1992). Fue caracterizada por un prolongado tiempo de sangría, baja actividad del factor VIII, anormal actividad plaquetaria, corto tiempo de actividad de la protrombina (Doods y *col.*, 1975).

La gravedad de la coagulopatía, puede ser muy variable; en general los signos clínicos que comúnmente se presentan son sangrados de mucosas, hemorragias gingivales, hematuria y melena. Menos frecuentemente se observan hematomas cutáneos producto del colapso por hemorragias de los capilares y vasos musculares. Comúnmente, los síntomas de esta enfermedad se observan durante las intervenciones quirúrgicas, aunque en forma leve (Denis y *col.*, 1999; Brooks y *col.*, 1996, 1999; Stefanon y *col.*, 1993; Gavazza y *col.*, 2002; Burgess y *col.*, 2009).

Esta enfermedad es causada por defectos cualitativos o cuantitativos, o por ambos a la vez, dependiendo de la concentración en

plasma de vWF o de la estructura del multímero (Brooks y *col.*,2000). Se han identificado tres tipos distintos de la enfermedad en perros. El **EvWtipo I** es la más frecuente diagnosticada (60 – 80 %), le sigue **EvW tipo II** (15-30 %) y por último **EvW tipo III** (5-10 %) (Federici y *col.*, 2002).

El **tipo I** está caracterizado por una deficiencia cuantitativa debido a una baja o ausencia completa de los niveles del vWF en sangre; este tipo es el más leve de los tres. Entre las razas más afectadas por EvW tipo I se encuentra la Doberman Pinscher, Manchester Terrier y Pembroke Welsh Corgi (Lubas y *col.*, 2002; Lubas y *col.*, 2010), siendo en los Doberman donde se observa con mayor prevalencia. Los animales enfermos resultan estar en serio riesgo de manifestar los signos clínicos, especialmente luego de traumatismos o durante intervenciones quirúrgicas simples como caudectomias, corte de orejas, corte del espolón, etc.

El **tipo II** se presenta como un defecto cualitativo, está asociado a la deficiencia del vWF en el plasma y al largo del multímero, donde se ven comprometidos los de mayor peso molecular, que son los hemostáticamente más activos. La raza Braco alemán de pelo corto es la principalmente afectada por este tipo de la enfermedad (Brooks y *col.*,1996; Lubas y *col.*,2002).

El **tipo III** es el más grave y letal, y está caracterizado por ausencia total del vWF en el plasma, aunque es la más rara de encontrar. Una de las razas en donde se presenta es la Terrier escoses (Venta y *col.*,1996; Brooks y *col.*, 1992).

En las razas que presentan **EvW tipo II y III**, los animales enfermos manifiestan siempre formas graves de la patología (Lubas y *col.*, 2002).

Métodos de diagnóstico

Como se mencionó anteriormente, la enfermedad fue caracterizada por un prolongado tiempo de sangrado, reducida actividad del factor VIII, anormal adhesividad de las plaquetas y corto tiempo de consumo de protrombina (Dodds y *col.*, 1975). Siendo que las deficiencias pueden ser cualitativas o cuantitativas, ninguna prueba individual es lo suficientemente amplia como para detectar todas las variantes de EvW. Por lo tanto, la determinación de las concentraciones de vWF y la función es importante en el diagnóstico (Paczuski y *col.*, 2002; Favaloro y *col.*, 1999). Actualmente, la prueba más común que se realiza es la prueba de detección del antígeno vWF (vWF/Ag). Este es un método inmunturbidimétrico que utiliza un anticuerpo monoclonal contra el sitio de unión a plaquetas (Glicoproteína Ib) de la molécula de vWF. Este epitope reconocido por el anticuerpo se expresa cuando la estructura multimérica es la adecuada, es decir que estén presentes los multímeros de alto peso molecular. Puede realizarse en equipos automatizados (coagulómetros) para los que fue diseñado, como en lectores de ELISA en forma semiautomática (Duboscq y *col.*, 2012).

Se ha observado que en grupos de perros con concentraciones de vWF (<15%), patrones de multímeros y hemostáticos similares, la tendencia al sangrado no fue consistente entre ellos. A partir de esto, se

hizo la sugerencia de que aparte de deficiencia en vWF, puede haber defectos adicionales en la interacción entre el vWF y el colágeno o las plaquetas que diferencia los animales con o sin fallas hemostáticas (Brooks y col.,2001).

En el análisis, la concentración de vWF/Ag, es la que se usa con mayor frecuencia para predecir el estado genético, por cuyos rangos informados incluyen EvW negativo (>70%), EvW positivo (< 50%). Si bien esta prueba puede identificar claramente perros con EvW tipo III, algunos diagnósticos de EvW de tipo I pueden quedar indeterminados. Además, la prueba no es muy efectiva para identificar la enfermedad tipo II, ya que es una deficiencia cualitativa en lugar de una deficiencia cuantitativa.

En pacientes con EvW, la actividad de unión del colágeno se reduce significativamente en comparación con la de los pacientes sanos. En los tipos I y III de EvW, la disminución en función de vWF es paralela al nivel de vWF/Ag, y en EvW tipo II hay una disminución desproporcionada en la actividad. La actividad de unión del colágeno, junto con el ensayo de vWF/Ag, puede por lo tanto ser utilizada para evaluar la cantidad de vWF así como también su función. Esto hace que estos ensayos sean valiosos no solo como pruebas de detección de EvW, sino también para distinguir entre los tipos I y II (Burgessy col.,2009).

En conclusión para poder establecer un diagnóstico en animales sospechosos o con trastornos de la hemostasia, se requiere una evaluación del perfil coagulante que comprende un número de pruebas como PT (tiempo de protrombina), aPTT (Tiempo de Tromboplastina

Parcialmente activado), fibrinógeno y medición cuantitativa del FvW/Ag llevadas a cabo con métodos validados en la especie canina. Los resultados de la determinación de FvW/Ag son expresados como un porcentaje respecto del plasma normal. Estos parámetros se recomienda relacionarlos con BMBT (tiempo de sangrado de la mucosa bucal) o con pruebas prueba de agregación plaquetaria (**Tabla 5**).

Tabla 5. Revisión de los criterios para el diagnóstico de EvW en perros de raza Doberman (Gavazza y col., 2002).

FvW:Ag (CU/dL)	BMBT	Clasificación de los pacientes
>70	normal	Individuo sano
70-79	normal	Límite mínimo del intervalo normal
50-69	normal	Valor incierto o heterocigota portador
31-69	no determinado	Valor incierto o heterocigota portador (Doberman)
<50	normal	EvW 1, o heterocigota portador
<50	elevado	EvW 1
<50	normal o elevado	EvW 2
<30	no determinado	EvW 1 (Doberman)
<0.01	elevado	EvW 3
>180	normal	Muestra incorrecta o valor influenciado por otra enfermedad

A finales de la década del '80 se ofrecían *test* diagnósticos basados en la medición de los niveles en plasma del vWF/Ag por

Rocket inmunoelectroforesis (Littlewoody *col.*, 1987). Esta prueba, que combina la electroforesis con la inmunodifusión radial, comenzó a usarse para identificar a los animales con niveles normales de vWF para poder usarse como reproductores en los criaderos. Si bien fue efectiva en diferenciar perros afectados y normales, no resultó confiable en animales con niveles medios del vWF, por lo que fue necesario realizar una prueba que monitoree directamente el gen vWF (Holmesy *col.*, 1996).

Posteriormente, Holmes y *col.* (1996) correlacionaron los resultados obtenidos con la prueba mencionada anteriormente y un microsatélite descrito por Shibuya y *col.* en 1994, un polimorfismo hexanucleotido en el gen canino vWF. Estos autores identificaron dos mayoritarios alelos en una población de 91 animales, uno con un tamaño de 157 pares de bases (pb) y otro de 163 pb. En el mencionado trabajo se pudo correlacionar el alelo de 163 pb con los animales que eran normales. Sin embargo, el alelo de 157 pb se encontraba tanto en animales sanos como enfermos, por lo que la ausencia de un ligamiento completo entre el microsatélite asociado al gen vWF y la enfermedad no permitió utilizar este polimorfismo como marcador genético.

Hasta finales de la década del '90, el *test* más preciso para la detección de la enfermedad EvW ha sido el ensayo del vWf. Sin embargo, con este tipo de análisis solo se puede detectar animales en apariencia enfermos (homocigotas para el alelo mutado) con riesgo de sangrado, ya que estos perros tienen niveles muy bajos del factor. Por el

contrario, los animales portadores de la mutación no pueden diferenciarse de los animales libres del alelo mutado.

En el año 2000, Venta y col. Publicaron la secuencia completa del gen vWF, y su consecuente secuencia de aminoácidos (US6074832), y describieron las mutaciones causales de EvW en las razas Scottish Terrier, Doberman Pinscher, Shetland Sheep dogs, Manchester Terrier y Caniche.

Al analizar las secuencias del vWF ARNm en perros Doberman afectados para la enfermedad de tipo I, se encontró un cambio en la última base del exón 43, una transición de G por A. Aunque esto ocasiona una mutación silente de aminoácidos, causa que la unión de empalme del ARNm difiera del sitio normal. Aguas arriba de la unión de empalme normal, se presenta otra secuencia que es similar a la secuencia consenso. Es por esta razón que la mutación activa un sitio de empalme críptico a unos pocos nucleótidos aguas arriba del sitio de empalme normal, lo que lleva a un cambio de marco de lectura que da como resultado la formación de una proteína truncada de 119 aminoácidos (Venta y col., 2000) (**Figura 5**).

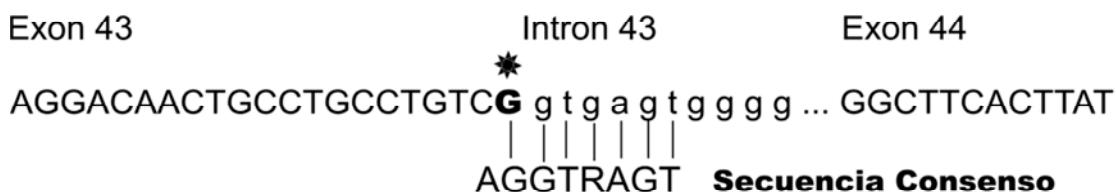
Alelo NormalAlelo Mutante

Figura 5. Esquema que muestra el sitio de empalme en comparación entre un alelo normal y uno mutado para el gen de vWF. (Venta y col., 2000).

Gentili y col. (2013) desarrollaron dos métodos de detección utilizando la técnica de PCR en tiempo real, para genotipificar las variantes alélicas de EvW tipo I en la raza Doberman Pinscher:

1) un ensayo de "PCR divergente" diseñado para identificar SNP bialélicos en un solo tubo, y con detección de fluorescencia en tiempo real. Este método amplifica el ADN utilizando un par de cebadores internos alelo-específicos y un par de cebadores externos (Hazbón y Alland, 2004; Gentilini y col., 2010). Se generan dos productos de PCR, que se pueden discriminar como dos bandas de diferente tamaño en un gel de agarosa o como picos separados por PCR en tiempo real.

2) un ensayo de MGB (*Minorgroovebinder*) PCR TaqMan en tiempo real que se lleva a cabo en un solo tubo de reacción. Ambos métodos desarrollados resultaron adecuados en la detección de la mutación responsable de EvW tipo I en Doberman Pinscher.

La tipificación por secuenciación masiva (NGS-Next Generation Sequence) hoy en día también es una alternativa en el diagnóstico de la enfermedad.

Genética y herencia

Los tres tipos de EvW están determinados por diferentes mutaciones en el gen vWF, localizado en el cromosoma 27 (*NCBI reference sequence NM_001002932.1*).

EvW tipo I

EvW es transmitida por un simple defecto de un gen autosómico (Riehl y col., 2001). EvW de tipo I canina es considerada una afección autosómica recesiva en algunas razas, aunque algunos autores la han considerado como una enfermedad genética con herencia dominante con penetrancia incompleta (Lubas y col., 2002; Riehl y col., 2001; Brooks y col., 2000; Stokol y col., 1993).

Los primeros estudios realizados en familias de raza Doberman destacaron la variabilidad en la expresión de los signos clínicos, por lo que se la consideró como una enfermedad autosómica con dominancia incompleta (Johnstone y col., 1981; Johnstone y col., 1986).

Posteriormente, Lubas (2002) propone que en base a caracterizaciones genéticas el modo de herencia es recesivo para las razas Dobermann, Manchester terrier, Poodle y Pembroke Welsh Corgi. Sin embargo, en otras razas mantiene como válida la teoría de una herencia autosómica con dominancia incompleta.

Venta (2004) destaca el modo de herencia para este tipo de mutación como recesivo. Sin embargo, en ciertas razas como la del Doberman Pinscher podría parecer dominante en ciertas situaciones.

EvW tipo II

Al clonar y secuenciar un probable gen candidato basado en el trastorno homólogo en otras especies, Kramer y col., (2004) mostraron que una posible variante causal para esta enfermedad en German Shorthaired Pointers era una sustitución de bases en el exón 28 del gen vWF (c.4937A> G; p.Asn1646Ser).

Más tarde, Vos-Loohuis y col. (2017) informaron que la variante causal más probable para este trastorno en un German Wirehaired Pointer es otra mutación sin sentido, c.1657T> G; p.Trp553Gly, y que esta mutación se encuentra exclusivamente en estado homocigota tanto en animales de las razas German Wirehaired Pointer y German Shorthaired Pointer que se ven afectados por la enfermedad de EvW. Por esta razón propusieron que esta era la mutación causal candidata para la afección de este tipo.

EvW tipo III

Basado en el trastorno humano homólogo, Rieger y col. (1998) demostraron que la base molecular de esta enfermedad en perros Dutch Kooiker es una mutación que produce un cambio en el marco de lectura del gen que codifica el vWF, específicamente una sustitución de G por A en la primera posición de la secuencia del sitio de empalme del intrón 16, que da como resultado un transcrito que contiene 46 bases de intrón, y crea un codón de terminación en la posición del aminoácido 729. Venta y col. (2000) informaron una única delección de bases en el codón para el aminoácido 85 como una mutación causal en Scottish Terriers.

EvW tipo I en el mundo

Como se mencionó anteriormente, EvW es el trastorno hemorrágico heredable más común en los perros. La EvW canina se informó por primera vez en 1970 en una familia de perros pastores alemanes, aunque, ahora es más común asociarla a perros de raza Doberman pinschers, con variadas y altas prevalencias en varios países. En 1981, se reportó una prevalencia del 63% en Norteamérica en esta raza (Dodds y col., 1981), y en estudios posteriores, realizados sobre Doberman de Italia Gavazza y col. (2002) reportaron un porcentaje de 36% de animales posiblemente con la enfermedad (estudios realizados en base a exámenes fenotípicos). Por otra parte, en regiones como el Reino Unido, se han reportado prevalencias de la enfermedad cercanas al 50%, en Brasil del 33,33% en Doberman y determinaron además que no hubo

diferencias significativas entre machos y hembras (Mattoso y col., 2010). Trabajos realizados en Polonia arrojaron resultados similares a los reportados en los países mencionados anteriormente (Wessely-Szponder y Szponder, 2001). Venta y col. (2004) reportaron una prevalencia de 46% de la enfermedad con una frecuencia del alelo mutado del 0,64 en la población de perros Doberman de Estados Unidos.

EvW en Argentina

En Argentina la cría de perros de la raza Doberman es una actividad importante y con un elevado número de animales que forman parte de este circuito. Si bien es conocida la enfermedad y sus consecuencias, no existen hasta el momento estadísticas que puedan llegar a dar una aproximación de la prevalencia de esta enfermedad en el país.

GEN DE RESISTENCIA A

MULTIDROGAS

(MDR1)- ATP- Binding cassette sub-family

B, member 1 (ABCB1)

La existencia del gen **MDR1** (*multiple drug resistance*) o como se lo denomina en la actualidad **ABCB1** (ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP), member 1), que codifica la gpP de células tumorales, se estableció en 1976, cuando estas células fueron resistentes a varias drogas anti cáncer y este fenómeno fue designado como “resistencia múltiple a las drogas” (Juliano y Ling, 1976). En su trabajo, Ueda y col. (1987) descubrieron que las células cancerosas que se volvían resistentes a los efectos de los medicamentos quimioterapéuticos, tenían un incremento en la expresión de la gpP y que este fenómeno se daba por el aumento de la transcripción de un gen al que denomino “Gen de resistencia a múltiples fármacos” (MDR1, de las siglas en inglés de *multiple drug resistance*). Este descubrimiento desencadenó múltiples investigaciones que demostraron que las cantidades de gpP se incrementaban tras la exposición a variados medicamentos.

La gpP es una proteína de membrana encargada de secretar drogas y diversos compuestos fuera de la célula a través de un mecanismo ATP dependiente; pertenece a la súper familia de las “ATP-Blinding Cassette” (ABC) y es codificada por una subfamilia de genes de las que se reconocen tres isoformas: MDR I, MDR II Y MDR III (Smith y col., 1993). La gpP es un complejo glicoproteico de membrana de 1.280 aminoácidos con un peso molecular 170 kDa. Está compuesta por dos mitades simétricas y homologas que actúan en forma coordinada como una unidad. Cada mitad consta de 6 dominios transmenbrana y de un dominio de unión al ATP. Varios modelos han sido propuestos para explicar el

mecanismo de excreción de fármacos mediado por gpP: el modelo del poro, el modelo de flipasa y el modelo de aspirador de moléculas hidrofóbicas. Este último ha sido el más aceptado y se caracteriza por el reconocimiento de sustratos localizados en la superficie interna y externa de la membrana plasmática y su transporte a través de canales proteicos (Higgings y col., 1992). En condiciones fisiológicas se expresa en altas concentraciones en varios tejidos y órganos (Correa Salgado, 2014), como hígado, riñón, intestino, testículo, placenta y adrenales, localizado en la superficie citosólica (Fardel y col., 1996). Si bien se ha determinado que ambos sitios de unión al ATP son necesarios para que la actividad de la gpP se produzca eficientemente, la interacción entre los sitios de unión al ATP y los dominios de unión a droga son esenciales para que se produzca la hidrólisis de ATP estimulada por el sustrato y el transporte del mismo. Mediante este mecanismo de transporte activo, los sustratos son secretados sin modificar fuera de la célula contra un gradiente de concentración, lo que provoca una disminución intracelular (Ambudkar y col., 1999; Triebaut y col., 1987; Kusuhara y col., 1998; Tanigawara y col., 2000).

La cantidad de compuestos que tienen la capacidad de interactuar con la gpP ya sea como sustratos inhibidores o inductores es muy amplia e incluye antiarrítmicos (lidocaína), antibióticos (eritromicina), antifúngicos (intraconazole), bloqueantes de los canales de calcio (verapamilo), antineoplásicos (vinblastina), hormonas (progesterona) y antiparasitarios

(Ivermectina, emodepside) (Harder y col., 2005; Fromm, 2003; Löscher y Potschka, 2005).

Mediante la utilización de anticuerpos monoclonales y moléculas específicas para gpP se demostró que esta proteína se localiza en tejidos involucrados en distintos procesos tales como: absorción (células epiteliales del intestino), distribución (barrera hematoencefálica) y eliminación de fármacos (superficie canalicular de los hepatocitos, superficie apical de las células epiteliales del túbulo renal y superficie apical de los enterocitos). También se encuentran en la superficie luminal de las células endoteliales del cerebro, células del sistema hematopoyético y corteza y medula adrenal (Lin y col., 2003; Wang y col., 2004).

En el año 2005, Dean recomendó sustituir el nombre MDR1 e incluirlo en la nomenclatura de los transportadores ABC, refiriéndose a este como *ABCB1* (Dean, 2005; Klintzsch y col., 2010). El gen *ABCB1* codifica la proteína gpP y junto con *ABCC1* y *ABCG2* son los responsables del desarrollo de resistencia a los fármacos contra el cáncer (Schricks y Fink-gremmels, 2008). En ratones, son dos los genes responsables de la producción de gpP, el MDR1 y el MDR2 (Correa Salgado, 2014).

Importancia de la sensibilidad a fármacos en perros

La **Ivermectina** ha sido y es ampliamente utilizada para el tratamiento de endo y ectoparásitos en animales y humanos, en

enfermedades tales como la demodicosis canina y la sarna sarcóptica, siendo su utilidad significativamente mayor a la de otros fármacos. Así por ejemplo, el uso de la Ivermectina administrada por vía oral a dosis de 600 mcg/kg diarias ha sido efectivo para tratar la demodicosis refractaria al amitraz (Medleau, 1994; Ristic y col., 1995; Wagner y col., 2000). La primera intoxicación con Ivermectina en perros de raza Collie fue descrita por Preston en 1983. Posteriormente, Tranquilli (1987) demostró que solo algunos Collies se intoxicaban y que con una mínima fracción de la dosis era suficiente para encontrar efectos adversos, comparados con perros de otras razas (Hugnet y col., 2004). A pesar de múltiples investigaciones, no se pudo encontrar la razón de esta sensibilidad racial. Sin embargo, los signos previos a la muerte de los ratones homocigotas para la mutación expuestos a la Ivermectina, recordaban la sintomatología que exhibían los Collie intoxicados con esta droga. Basado en estos hallazgos, Mealey en 2001 descubrió que la sensibilidad de estos perros pastores se debía a una mutación en el gen ABCB1 (Mealey y col., 2005; Correa y Castaño, 2014).

Estudios realizados por Neff (2004), intentaron encontrar el origen de la mutación, teniendo en cuenta las genealogías de las razas Collies y Pastor Australiano, así como también en base a registros de sensibilidad a la Ivermectina en razas como Viejo Pastor Ingles y Shetland Sheepdogs, siendo que estas últimas también comparten algún tipo de linaje con los Collie.

En resumen, se tuvo en cuenta el linaje (presumiblemente compartido con la raza Collie) y el fenotipo (reporte de sensibilidad a fármacos). Se encontró que dos tipos de perros segregaron el mutante, siete razas del linaje collie y dos razas de la clase sabueso.

El alelo fue idéntico en toda la descendencia entre ambos tipos evidenciándose un único haplotipo ancestral. La mutación ABCB1-1 Δ se ha reportado en 12 razas de perros y ocasionalmente en perros mestizos. La mayoría de los animales portadores corresponden a perros pastores, como el pastor Collie, Shetland sheep dog, Old english sheep dog, Australian shepherd, Bordercollie, Pastor alemán, English shepherd, White swiss shepherd, McNab, Waller y en dos razas de perros cazadores, el Longhaired whippet y el Silken windhound, estos dos últimos con genes de perros pastores en sus ancestros (Gramer y col., 2011; Nelsony col., 2003; Geyer y col., 2007; Fecht y col., 2007; Baars y col., 2008; Tappin y col., 2008) (**Figura 6**).

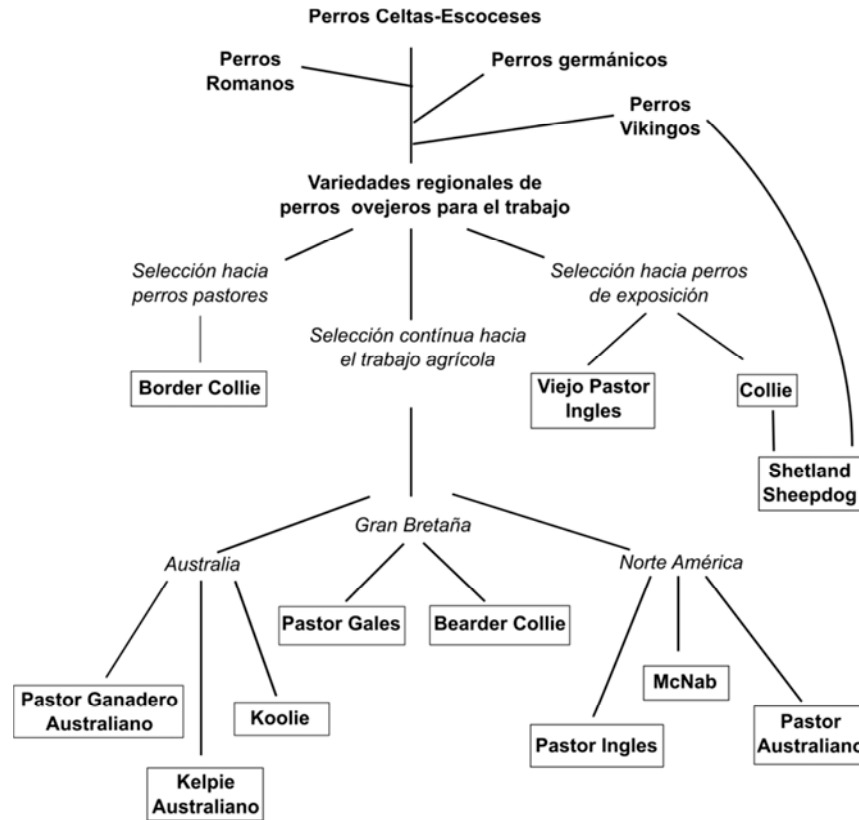


Figura 6. - El diagrama representa las relaciones históricas reportadas entre las razas de pastoreo contemporáneas que comparten el linaje Collie fuera de Gran Bretaña. Las razas mostradas presentaron reportes de la mutación (Neff y col.2004).

En La Argentina, Pérez Tort y col. (1999) trataron 22 caninos con demodicosis refractaria, a los que se administró Ivermectina a la dosis de 600 mcg/Kg/día/PO. La duración media del tratamiento fue de 3 meses y medio, aunque 5 perros requirieron 8 meses de tratamiento y un canino mejoró clínicamente, sin embargo los raspados nunca fueron negativos (Perez Tort y col., 2002).

Esta particular sensibilidad a la droga ha sido designada en la literatura como “**Collie sensible a la Ivermectina**”. A posteriori de la administración de 600mcg/kg por vía oral de Ivermectina en estos animales la concentración de esta droga fue 31 veces superior en el cerebro que en el plasma, mientras que en perros de otras razas las concentraciones en el sistema nervioso central fueron de 1 sobre 10 a 1/100 de las concentraciones plasmáticas (Pulliam y col.,1985). Esto indica una gran penetración de la Ivermectina a través de la barrera hematoencefálica y la reducida eliminación de la droga del cerebro en estos Collies. Los signos clínicos reportados luego de la intoxicación con Ivermectina fueron ataxia, desorientación, obnubilación, bradicardia, midriasis, e hipersalivación, en casos más graves se pudo observar parálisis y coma (Hooper y col., 2002).

Métodos de estudio y diagnóstico

Si bien hoy en día, en los tratamientos antiparasitarios en perros de razas susceptibles a la Ivermectina no se utiliza esta droga, previendo reacciones neurotóxicas, se recomienda realizar test moleculares de

diagnóstico temprano basados en la detección de la mutación nt 230 (del4) por PCR-Electroforesis en gel de poliacrilamida, PCR-RFLP (Dostal y col., 2011), Secuenciación, PCR Real Time,(Gentili y col., 2010; Kohyama y col., 2015), Pyrosecuenciación (Zangerl y col., 2006), NGS (New Generation Sequencing) u otra técnica de genotipificación.

Genética y Herencia

Mealey y colaboradores (2001) identificaron en una subpoblación de Collies una deleción de 4 pares de bases (ATAG o GATA) en el exón 4 en la posición 230 del gen ABCB1, *Member 1*((c.227_230delATAG (Fridova y col., 2016)), que se ubica en el cromosoma 14 y que codifica para la proteína gpP. Esta mutación produce un cambio sin sentido en el aminoácido de la posición 75 generando un codón prematuro de terminación, y por lo tanto una gpP truncada que en lugar de tener 1.281 aminoácidos tiene 91 (Geyer y col., 2005; Mealey y col., 2001).

Se realizaron intentos de detección de la proteína no funcional con análisis por Western blot sobre perros sensibles a la Ivermectina y no resultó detectable (Roulety col., 2003). Mealey y col.,(2001) demostraron en un estudio con 17 Collies que todos los perros con fenotipo sensible a la Ivermectina resultaron homocigotas para la mutación. Sin embargo, ninguno de los perros heterocigotas u homocigotas normales presentó signos del fenotipo sensible, lo que llevo a suponer que se trataría de un tipo de herencia autosomal recesiva (Geyer y col., 2005).

La relación entre el genotipo heterocigoto y efectos adversos farmacológicos en perros ha recibido poca atención. Estos se consideraban más resistentes que los homocigotos para la mutación. Sin embargo, evaluaciones recientes destacan que esto no es del todo cierto, ya que se detectan tasas de excreción biliar disminuidas e incremento en las vidas medias plasmáticas de los fármacos en estos perros (Sherman, 2011). Un estudio que evaluó la eliminación de fármacos radiomarcados sustratos de la GpP, demostró que dicha excreción se encontraba altamente disminuida en pacientes homocigotos para la mutación ABCB1-1 Δ y que bajaba ligeramente en los heterocigotos, comparados contra perros sin la mutación (Coelho y col., 2009).

Un perro sin la mutación, tolera dosis de Ivermectina de 2.500 mcg/kg sin exhibir toxicidad, un animal heterocigota sufre toxicidad si recibe dosis seriadas de 600 mcg/kg, mientras un perro homocigoto para la mutación sufrirá toxicosis grave con una dosis única de 120 mcg/kg (Mealey, 2008). Debido a que una sola dosis de Ivermectina es suficiente para mantener niveles plasmáticos del fármaco durante 25 días (Gokbulut y col., 2006), las dosis seriadas se convierten en altamente riesgosas para los heterocigotos (Mealey, 2008; Correa y Castaño, 2014).

Se trata por lo tanto de una herencia monogénica recesiva con dominancia del alelo normal sobre el mutante. Pero hay que tener en cuenta que la dominancia puede no ser completa, ya que los animales heterocigotas al tener solo una copia del gen funcional expresarán menos

gpP de la normal, y en algunos casos esto no va a ser suficiente para la función normal de dicha proteína (Pelaez de Lucas, 2013).

Mutación nt 230 (del4) en el mundo

Estudios realizados hasta el momento en distintos países muestran variadas prevalencias de la mutación nt230 (del 4) en las poblaciones de Collies, BorderCollies, SheetlandSheepdog, y otras razas portadoras. Sin embargo, es de destacar que en la mayoría de los casos se han reportado prevalencias elevadas. En promedio se puede encontrar que cerca del 30% de los Collies son homocigotas para la mutación y presentan una marcada susceptibilidad a la toxicidad por administración de Ivermectina. Cerca del 45% tienen un alelo mutado y los restantes son homocigotos normales para el gen ABCB1. Como se mencionó, otras razas también presentan esta mutación. Sin embargo, la frecuencia con la que se encuentra el alelo mutado es menor.

Para la raza Collie, la prevalencia reportada para esta afección es bastante alta, en Estados Unidos, Mealey y col. (2002) publicaron que un 35% de animales presentaron genotipo homocigota para la mutación nt 230 (del4) (-/-), con una frecuencia alélica de $q=0,56$, centrando su estudio en animales correspondientes al norte del país. Sin embargo, Neff y col. (2004) con un muestreo 5 veces más grande y más amplio reporta un 28% de animales -/- con una frecuencia alélica de $q=0,51$.

En Francia, Hugnety col. (2004) reportaron con un 48% de homocigotas -/-, con una frecuencia del alelo mutado de $q=0,64$. Esto

resultados fueron similares a lo publicado por Neff y colaboradores (2004) para la población de Collies de Reino Unido, donde reporta una prevalencia de animales homocigotas $-/-$ de 34%, con una frecuencia de $q=0,6$.

En 2005, Mealey y col. en un estudio de Collies de Australia encuentran una prevalencia de animales homocigotas $-/-$ de 24% y una frecuencia alélica de la mutación de $q=0,56$.

En el trabajo realizado por Geyer y col (2005) para poblaciones de perros Collies y razas relacionadas de Alemania reportan una frecuencia alélica de $q=0,55$ con un porcentaje de perros homocigotas $-/-$ de 33%.

Kawabata y col. (2005) reportaron en Japón una frecuencia alélica de $q=0,58$ y un porcentaje de animales $-/-$ de 41,7%. En Collies de Bélgica, Erkens y col. (2009) encontraron una prevalencia de 29% de animales enfermos con una frecuencia del alelo mutado de $q=0,4$.

Recientemente, en estudios realizados también en Alemania por Stield y col. (2017) se encontraron frecuencias alélicas y una prevalencia similares a las encontradas por Geyer y col. (2005).

Respecto de las prevalencias en perros de otras razas, los valores encontrados son mucho menores a los Collies. Así por ejemplo, en el caso de la raza Border Collie, la prevalencia del alelo nt230 [del4] reportada por Gramer (2011) fue de 0,01; la reportada por Greyer y col. (2005) fue de 0,006 y la publicada por Huebner y col. (2007) y Stield y col. (2017) fue de 0. Si bien estas frecuencias son relativamente bajas, se

debería tener especialmente cuidado con esta raza en el tratamiento con drogas que son gpP sustratos.

En cuanto a la raza Pastor de Shetland, la frecuencia del alelo mutado ronda el 0,3 (Huebner y col., 2007; Gramer y col., 2011, Stiedl y col. 2017). Neff y col. (2004) en su estudio de razas relacionadas reportó la presencia de la mutación, y encontró frecuencias relativamente altas en las razas Pastor Ovejero Australiano miniatura, Whippet de pelo largo, Silken Windhound y en Pastor de Shetland, con frecuencias de q de 0,25, 0,41, 0,18 y 0,08, respectivamente.

En el año 2016, Firdova y col. publicaron un trabajo realizado con perros de Europa originarios de varios países (República Checa, Alemania, Finlandia, Reino Unido, Francia, Hungría y Polonia), donde calcularon la frecuencia del alelo mutado y la prevalencia de la afección en cada uno y en la región en general (**Tabla 6**). Se destaca que la frecuencia de la mutación en la población de Collies de la mayoría de los países varió entre 0,5 y 0,62, con un porcentaje de animales homocigotas para la mutación de entre 30-40%. Estos valores se presentan en menor medida en Alemania con $q=0,35$ y 13% (**Tabla 7**).

En conclusión, entre las razas portadoras se destacan los Collies en primer lugar con un $q>0,5$ y cerca del 32 % de perros homocigotas para la mutación. También se puede observar que en la población analizada de Border Collie, la frecuencia del alelo mutado fue 0.

Tabla 6. Frecuencia alélica de la mutación nt 230 (del4) y genotípicas para las distintas razas analizadas en países europeos. (Fridova y col. 2016)

Raza	N	Frecuencia del alelo mutado	Genotipo (%)		
			ABCB1 (wt/wt)	ABC1 (wt/del)	ABCB1 (del/del)
Collie de pelo largo	1310	48,3	28,3	46,9	24,8
Collie de pelo corto	389	58,5	20,6	41,9	37,5
Shetland Sheepdog	1400	30,3	48,6	42,4	9
Pastor australiano	907	35	41,2	47,5	11,3
Pastor australiano miniatura	92	26,1	53,9	40	6,1
SilkenWindhound	105	28,1	47,6	48,6	3,8
Whippet de pelo largo	138	24,3	52,2	47,1	0,7
Pastor blanco suizo	234	16,2	68,4	30,8	0,8
BorderCollie	116	0	100	0	0
Akita-Inu	38	0	100	0	0

Tabla 7. Frecuencias alélicas y genotípicas en los distintos países de la mutación nt 230 (del4).

Raza	País	N	Frecuencia alelo mutado (%)	Frecuencia Genotípica (%)		
				ABCB1 (wt/wt)	ABC1 (wt/del)	ABCB1 (del/del)
Collie	Rep.Checa	346	50	24	46,8	29,2
	Alemania	258	35,1	43	43,8	13,2
	Finlandia	214	60,7	17,8	43	39,2
	U.K.	184	50,5	27,2	44,6	28,2
	Francia	182	53,6	22	48,9	29,1
	Hungaria	98	61,2	16,3	44,9	38,8
	Polonia	79	55	21,5	46,8	31,7
Shetland Sheepdog	Francia	511	34,7	42,7	45,2	12,1
	Rep. Checa	247	25,9	51,4	45,3	3,3
	Polonia	136	39,3	56,6	8,1	35,3
	Alemania	91	17,6	64,8	35,2	0
	España	86	30,8	46,5	45,3	8,2
	Holanda	57	36	43,9	40,4	15,7
	Austria	55	14,5	74,5	21,8	3,7
	Finlandia	39	30,8	51,3	35,9	12,8
Australian Shepherd	Hungria	25	36	32	64	4
	Francia	223	33,6	41,7	49,3	9
	Rep. Checa	195	35,9	39	50,2	10,8
	Polonia	90	45	26,7	56,7	16,6
	Austria	90	25	57,8	34,4	7,8
	Alemania	87	34,5	42,5	46	11,5
	Belgica	49	29,6	46,9	46,9	6,2
White Swiss Shepherd	Hungria	24	39,6	37,5	45,8	16,7
	Dinamarca	93	18,8	62,4	37,6	0
	España	37	9,5	81	19	0
	Polonia	31	24,2	64,5	29	6,5
	Eslovenia	16	18,75	62,5	37,5	0
	Hungria	12	12,5	75	25	0
Francia	10	20	60	40	0	

Mutación nt 230 (del4) en Argentina

En la actualidad, no se encuentran disponibles test diagnósticos para esta afección en la Argentina. En los perros que son considerados dentro del grupo de riesgo, en la clínica diaria no se utiliza el tratamiento con drogas que sean sustrato de la gpP.

Esta situación ha llevado a que las estadísticas disponibles sobre la prevalencia de esta afección en las poblaciones locales de perros pastores no existan.

HIPOTESIS Y OBJETIVOS

HIPOTESIS

La prevalencia de las diferentes enfermedades de origen genético en perros varía significativamente según la raza y país/región de estudio, así como también, las mutaciones causales de estas patologías varían entre razas o grupos de razas.

Las mutaciones para las enfermedades **Degeneración Progresiva de Conos y Bastones (PRCD)**, **Von Willebrand Tipo I (EvW I)** y **Gen de Resistencia a Multidrogas 1 (MDR1 / ABCB1)** están presentes en Argentina, afectando a diferentes razas; es posible detectarlas molecularmente, y las frecuencias de cada uno de los alelos mutados en las poblaciones locales estudiadas es muy variable respecto de otros países, teniendo en cuenta el alto nivel de estructura interracial, el alto grado de consanguinidad intraracial y mayormente al efecto del reducido grupo fundador de cada raza en nuestro país.

OBJETIVOS

Objetivo General

Evaluar la prevalencia de tres enfermedades de origen genético (PRCD-PARA, EVW de Tipo I y MDR1/ABCB1) en poblaciones locales de razas caninas.

Objetivos específicos

1. Desarrollar un método rápido de genotipificación para PRA-PRCD mediante la técnica de Pirosecuenciación.
2. Confirmar la mutación causal de la enfermedad de PRA-PRCD y evaluar la prevalencia en las poblaciones locales de Labrador Retriever y Caniches Toy.
3. Desarrollar un método rápido de genotipificación para EVW de tipo I mediante la técnica de Pirosecuenciación.
4. Confirmar la mutación causal de la enfermedad de EVW de tipo I y evaluar la prevalencia en las poblaciones locales de Doberman.
5. Desarrollar un método rápido de genotipificación para MDR1 mediante la técnica de Pirosecuenciación.
6. Confirmar la mutación causal de la enfermedad de MDR1 y evaluar la prevalencia en las poblaciones locales de perros Collie, Border Collie y otras razas de perros pastores.

MATERIALES Y MÉTODOS

El presente estudio fue autorizado por el Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (CICUAL) de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional de La Plata, Argentina (Exp.:600-007197/11, Nro. de Protocolo 87-4-18T).

Animales de experimentación

Para el presente estudio se utilizaron animales de distintos orígenes, que se analizaron en el Servicio de Diagnóstico Genético del Instituto de Genética Veterinaria “Ing. Fernando Noel Dulout” (IGEVET).

Algunas muestras provinieron de: la Federación Cinológica Argentina (FCA-<http://www.fca2000.org.ar/index.php/esp/>), de criaderos particulares, y de animales tratados en el Hospital Escuela de la Facultad de Ciencias Veterinarias de La Plata de la UNLP.

Todas las muestras que se colectaron con el correspondiente consentimiento informado (**Anexo 1**) de los dueños de los animales, detallando el tipo de uso y el estudio al que iba a ser sometido con el material obtenido.

Las razas que se utilizaron se seleccionaron en base a la demanda sobre análisis de las enfermedades en cuestión que existía en el Laboratorio del IGEVET y teniendo en cuenta las prevalencias reportadas de las enfermedades en otros países (**Tabla 8**).

Tabla 8. Razas incluidas para el estudio de las enfermedad de Atrofia Progresiva de Retina - Degeneración Progresiva de Conos y Bastones (PRCD), Gen de Resistencia a Multidrogas 1 (MDR1/ABCB1), y von Willebrand tipo 1 (EvW1).

Enfermedad	Raza	N=
PRCD	Labrador Retriever	61
	Raza Caniche Toy	67
EvW Tipo I	Doberman Pinscher	111
	Collie	30
MDR1/ABCB1	Border Collie	18
	Pastor de Shetland	12

Degeneración Progresiva de Conos y Bastones

Para el estudio de la enfermedad PRCD se analizaron 128 perros de las razas Labrador Retriever y Caniche Toy,

Diez de los perros de la raza Caniche Toy presentaban signos oftalmológicos correspondientes a algún tipo de trastorno visual, con estudios electroretinográficos positivos para atrofas de retina.

Enfermedad de von Willebrand tipo 1

Para el estudio de la enfermedad EvW Tipo I se estudiaron 111 perros de la raza Doberman Pinscher. Basados en los datos genealógicos de los animales muestreados se separaron en tres grupos: uno de ellos compuesto por 34 perros, el siguiente compuesto por 13 animales; los

integrantes de estos dos grupos mantenían relaciones de parentesco entre sí. El tercer grupo fue constituido por 64 perros que no estaban relacionados entre ellos.

A 41 de los 111 perros fue posible realizarles análisis de laboratorio correspondientes a pruebas de coagulación y tiempo de sangría. También se tomó en cuenta su historia clínica, cirugías previas, partos y otros episodios de posibles sangrados. En el **Anexo 3** se detallan las técnicas empleadas para medir estas variables.

Resistencia a multidrogas

Para el estudio de MDR1 se utilizaron 73 muestras de animales de diferentes razas provenientes de distintas zonas de la provincia de Buenos Aires: 60 perros pastores (Grupo 1 – Sección 1, Federación Cinológica Internacional) de los cuales 30 eran de la raza Collie, 18 de la raza Border Collie, 12 de la raza Pastor de Shetland. También de incluyeron en el estudio 13 perros seleccionados al azar de razas no incluidas en la categoría de perros pastores (2 Airedale Terrier, 1 Bulldog Francés, 2 Caniche Toy, 2 Doberman, 2 Dogo Argentino, 1 Fox Terrier Wire, 2 Golden Retriever y 1).

Tipos de Muestras

Se utilizaron dos tipos de muestras:

- Sangre
- Hisopado bucal

Las mismas fueron obtenidas por Veterinarios miembros del IGEVET, por profesionales del Hospital Escuela, por los Veterinarios de la FCA o de los establecimientos privados.

Las muestras de sangre entera fueron extraídas con anticoagulante EDTA al 6%, por venopunción cefálica o safena, siguiendo un protocolo previamente enviado (**Anexo 2.1**) junto con los tubos con el anticoagulante EDTA 6% y trasladadas refrigeradas al laboratorio.

Para los hisopados bucales se utilizaron Colectores Endocervicales (REF 100005 – MEDIBRUSH ® XL), siguiendo el protocolo de toma sugerido por el IGEVET (**Anexo 2.2**).

Para el estudio de EvW de tipo I, de algunos animales pertenecientes mayormente a criaderos particulares, se tomaron además muestras de sangre en tubos con citrato de sodio 130 mmol/l (3,8%) o 109 mmol/l (3,2%) para la realización de las pruebas de determinación del Tiempo de tromboplastina parcial activada (APT Test) y para la determinación del Tiempo de Protrombina en una etapa (SOLUPLASTIN; Weinerlab. 2000 Rosario – Argentina)

Datos obtenidos de los animales muestreados

De los animales que se muestrearon se relevó la mayor información posible en base a su disponibilidad, ya que no en todos los casos fue posible obtener todos los datos requeridos.

La planilla utilizada incluía los siguientes datos:

CÓDIGO	Tipo de muestra	RAZA	SEXO	EDAD	PELAJE	ORIGEN	RESIDENCIA	NOMBRE	Observaciones
--------	-----------------	------	------	------	--------	--------	------------	--------	---------------

Código: Código de laboratorio interno que se le otorgó a la muestra.

Tipo de muestra: Hisopado bucal o Sangre.

Raza: del perro muestreado.

Sexo: Hembra / Macho.

Edad: Meses / Años del perro.

Pelaje: Color de pelaje

Origen: Lugar de donde provino la muestra (Hospital Escuela de la Facultad, Federación Cinológica, Particulares, etc.).

Residencia: Zona de residencia del animal.

Nombre: Nombre del animal.

Observaciones: Se asentó algún dato de la historia clínica que tuviera relevancia con la enfermedad en estudio.

Exámenes clínicos

Para el estudio de **PRCD** se obtuvieron datos clínicos con la colaboración del servicio de Oftalmología del Hospital Escuela de la Facultad de Veterinaria de la UNLP y de clínicas veterinarias privadas,

debido a que se muestrearon animales que se les habían practicado exámenes clínicos, tales como electroretinografías.

Para la **EvW Tipo I**, se pudo tener acceso a análisis clínicos y hematológicos previamente realizados en muchos de los animales muestreados. Se obtuvo:

- 1) el tiempo de protrombina (TP); esta técnica evalúa la vía extrínseca y común (factores VII, X, V, II y I). Al plasma citratado se le adiciona tromboplastina y cloruro de calcio y se espera la formación del coagulo. Se mide el tiempo que tarda la sangre en coagularse. y se realiza usando el *kit* comercial Soluplastin (Wiener LabGroup, Rosario, Argentina).
- 2) el tiempo de tromboplastina parcial activada (kPTT) que es una prueba sensible de deficiencia de factor procoagulante en plasma y de la presencia de ciertos inhibidores de la coagulación. Es eficiente para detectar anomalías en la coagulación intrínseca de los factores XIII, IX, XI y XII. Esta prueba se realizó usando el *kit* comercial APT Test (Wiener LabGroup).
- 3) El tiempo de sangría, que se realizó con dos metodologías diferentes, una denominada Método de Duke (**Figura 7**) (**Anexo 3.1**) y otra realizando una incisión en la mucosa labial (**Anexo 3.2**).



Figura 7. Toma de tiempo de Sangría por el Método de Duke.

Para el caso de la enfermedad del **Gen de Resistencia a Multidorga 1**, no se registraron datos clínicos ya que es muy difícil obtener diagnósticos clínicos para esta afección.

Procesamiento de las muestras

Extracción de ADN

Para la obtención del ADN genómico de cada una de las muestras se utilizaron distintos métodos de extracción.

Para las muestras de sangre se usaron la técnica clásica de purificación mediante solventes orgánicos (fenol: cloroformo)(**Anexo 4.2**), especialmente en caso de muestras de sangre en mal estado y mal conservadas, y *kits* comerciales de extracción como Wizard ® Genomic DNA Purification Kit (Promega, Madison, WI, USA) (**Anexo 4.1**).

Para las muestras de hisopado bucal se emplearon los métodos que utilizan resinas tipo Chelex (**Anexo 4.3.1**), basado en lisis celular y extracción con proteinasa K (**Anexo 4.3.2**) y un *kit* comercial como QIAmp ® DNA Investigator KIT (**Anexo 4.3.3**).

Cuantificación del ADN extraído

Para confirmar la presencia e integridad del ADN genómico, el producto obtenido en las extracciones fue sometido a corridas electroforéticas en geles de agarosa al 1% en TBE 1x durante 30 min. a 100 volts. (**Anexo 5**) (**Figura 8**). Posteriormente, el ADN obtenido se cuantificó utilizando un espectrofotómetro NanoVue (GE HealthCare) (**Figura 9**).

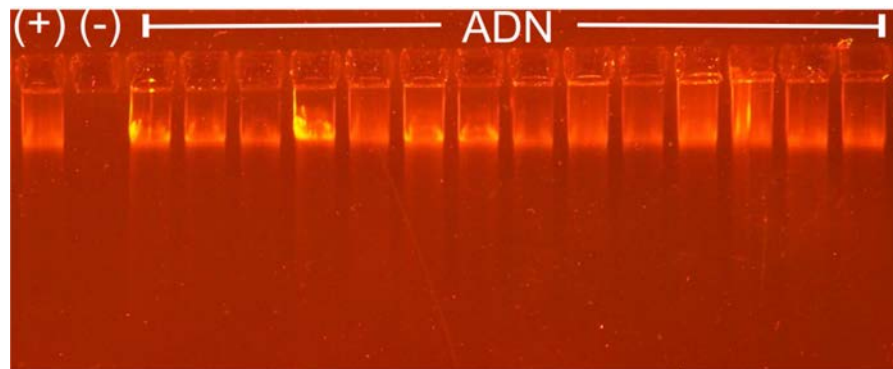


Figura 8. Gel de agarosa al 1%, utilizado para confirmar la presencia e integridad del ADN genómico. (+): control positivo; (-): control negativo



Figura 9. Espectrofotómetro NanoVue (GE HealthCare).

Genotipificación

Con el fin de desarrollar los métodos de genotipificación para las mutaciones causales de las enfermedades caninas PRCD, EvW y MDR1, se siguieron las siguientes etapas:

- 1) bajar las secuencias de ADN de la base de datos **GenBank** (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) correspondiente a cada uno de los genes causales de dichas enfermedades, teniendo en cuenta la bibliografía consultada.
- 2) con estas secuencias de ADN (Gene ID: 403879, 100049006, 399544) se diseñaron tres pares de *primers* que flanqueaban las mutaciones causales (**Tabla 9**).
- 3) En cada caso, uno de los *primers* (*forward* o *reverse*) fue modificado agregándole en el extremo 5' un sitio de pegado para el primer universal de M13. Esto fue utilizado en las reacciones de Pirosecuenciación, donde se agregó a la reacción un *primer* M13 con la biotina necesaria para el proceso.

Tabla 9. Secuencia de los *primers* diseñados para la amplificación de los fragmentos analizados por pirosecuenciación. T_m = temperatura de melting.

Gen	Secuencia 5´-3´	Tamaño	T _m (°C)	Región
MDR 1	F- CATCCATGGAGCTGCACTCCC R-M13-TCAAACCTCTAAGATCAGTGCCACA	150	60	EXON 4
PRCD	F- TTTCTCCTGCAGACTCTGTCC R- BIOT-GCCAAGGTGCTGAGTAGGAA	80	58	EXON 1
VWF	F- TGTGCACCTGCACGGACTT R- M13-TGCCTTTCACCCAACCTCAGT	240	58	EXON 43
M13	AGCGCATAACAATTTACACACAGG			
MDR1-int	GCTGGTTTTTGGAAACATGAC			
PRCD-int	GGGGCAGCTGAGCCA			
VWF-int	TGTGAGGACAACTGCCTG			

Secuencias utilizadas

A continuación se muestra un fragmento de la secuencia de cada gen estudiado, la localización de los *primers Forward* y *Reverse* (sombreado gris) y la del *primer* interno para el Pirosecuenciador (color rojo) y las mutaciones reportadas como causantes de las enfermedades (sombreado negro):

Gen **PRCD** – Progressive Rod-Cone Degeneration

Cromosoma 9 (Exón 1) - NM_001097560.2

CAGCAGGAACCTCAGGATGGGCAGCAGTGGCTTGTGAGAGCCGGCAGGGCCATTTTGGCC
 TTTCTCCTGCAGACTCTGTCCGGGAGGGGATGGGGCAGCTGAGCCATGTG/AACACCACC
 TCTTCCTACTCAGCACCTTGGCCATGCTCTGGCGCCGCGGTTTCGCCAACCGGGTCCAAC
 CGTGAGAAGCTGATGGGGCCATGGGCA

Gen **vWF** – von Willebrand Factor

Cromosoma 27 (Exón 43) - NM_001002932.1

GTTCTGGGAGGAGGCCTGTGACGTGTGCACCTGCACGGACTTGGAGGACTCTGTGATGGG
 CCTGCGTGTGGCCCAGTGCTCCCAGAAGCCC GTGAGGACA ACTGCCTGTG/AGTAAGG
 GGAGCAGAGGGGCTGGGCGCTGCCTGGAGCAGGCAAGGGAGAGAGTGGGGGAGTGGGTTC
 TGGGAAGGGGCAAGAGACCCCTTGAGTAATTTCTGGTTCAGGGCCAGAGATGAGGGGAAG
 GAGAGGACTGAGGTTGGGTGAAAGGCAGCATTAGGGGAGGATT

Gen **ABCB1** - ATP binding cassette subfamily B member 1 (MDR1)

Cromosoma 14 (Exón 4) - NM_001003215.2

ATATGTTGGTGGGACAATGGCTGCCATCATCCATGGAGCTGCACTCCCTCTCATGATGC
 TGGTTTTTGGAAACATGACAGATAG/-
 CTTTGCAAGGAATTTCAAGAAACAAACTTTTCCAGTTATAATTAATGAAAGTAAGTATT
 ATTTGTGGCACTGATCTTAGAGGTTTGAAGAAAAATCTG

Secuenciación de los productos de amplificación

Las reacciones de PCR para secuenciación se llevaron a cabo en un volumen total de 25 μ l en una solución de reacción que contenía:

Agua Destilada	11,3 μ l
Buffer	2,5 μ l
dNTP's	2 μ l
Cl ₂ Mg	2 μ l
Primer – F (5 μ M)	2,5 μ l
Primer – R (5 μ M)	2,5 μ l
Taq. Polimerasa	0,26 μ l
ADN molde	2 μ l

Se estandarizaron las condiciones de las reacciones en cuanto a las temperaturas y tiempos utilizados.

Las condiciones finales de reacción para el amplificación del fragmento para Secuenciación fueron: 1 ciclo de 5 minutos a 94°C seguido de 35 ciclos de 30 segundos a 94°C, 45 segundos a la temperatura de annealing correspondiente (**Tabla 9**), 45 segundos a 72°C y una elongación final de 10 minutos a 72°C.

Para la amplificación de los fragmentos de interés se utilizaron dos equipos termocicladores (**Figura 10**).

Los productos del PCR se chequearon en geles de poliacrilamida 6% en TBE1X, utilizando un marcador de peso molecular (PM) (INBIO HIGHWAY) (**Anexo 6**).

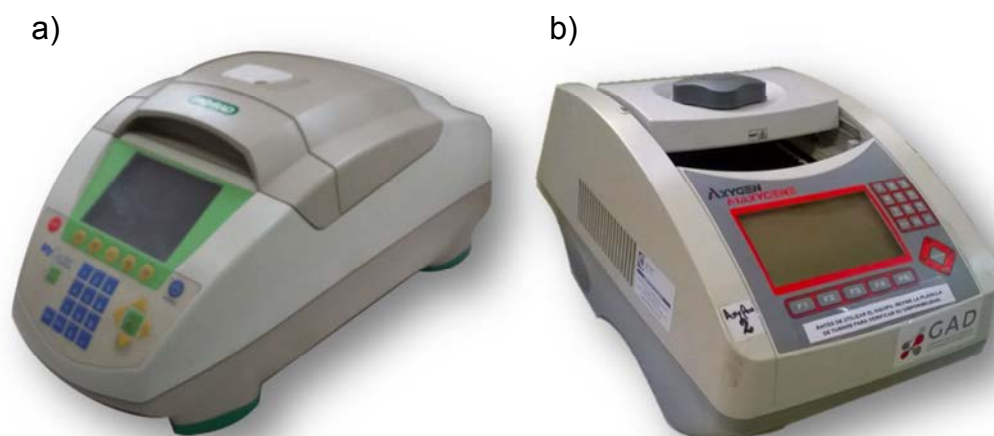


Figura 10. Termocicladores utilizados en el estudio. BioRad – My Cycler™ Thermal Cycler (a) y Axy Gene Maxi Gene (b).

Una vez obtenido, el producto amplificado se purificó mediante una precipitación diferencial con polietilenglicol (PEG) (**Anexo 7.1**) con el fin de eliminar los dNTPs, *primers* y dímeros de *primers*.

El ciclado para la reacción de secuenciación consistió en: 40 ciclos de 20 segundos a 95°C, 15 segundos a 50°C y 1 minuto a 60°C. Utilizando ente 120 y 140 ng de ADN molde en 10 µl finales de reacción (**Anexo 7.2**)

Posteriormente, los productos de secuenciación fueron purificados para eliminar los *primers* y los nucleótidos fluorescentes no incorporados. Para ello, se realizó una precipitación con acetato de amonio y etanol (**Anexo 7.3**).

Los productos de las reacciones de secuenciación se corrieron con un secuenciador *Secuenciador Genetic Analyzer ABI 3500* (Applied Biosystem, USA). Este secuenciador utiliza la tecnología de electroforesis capilar que proporcionan una alternativa clara al sistema basado en geles de acrilamida/bisacrilamida donde este soporte ha sido sustituido por un polímero que se inyecta de forma automática en un capilar antes de cargar el producto purificado de la reacción de secuenciación; las muestras se van analizando una a una (**Figuras 11 y 12**).

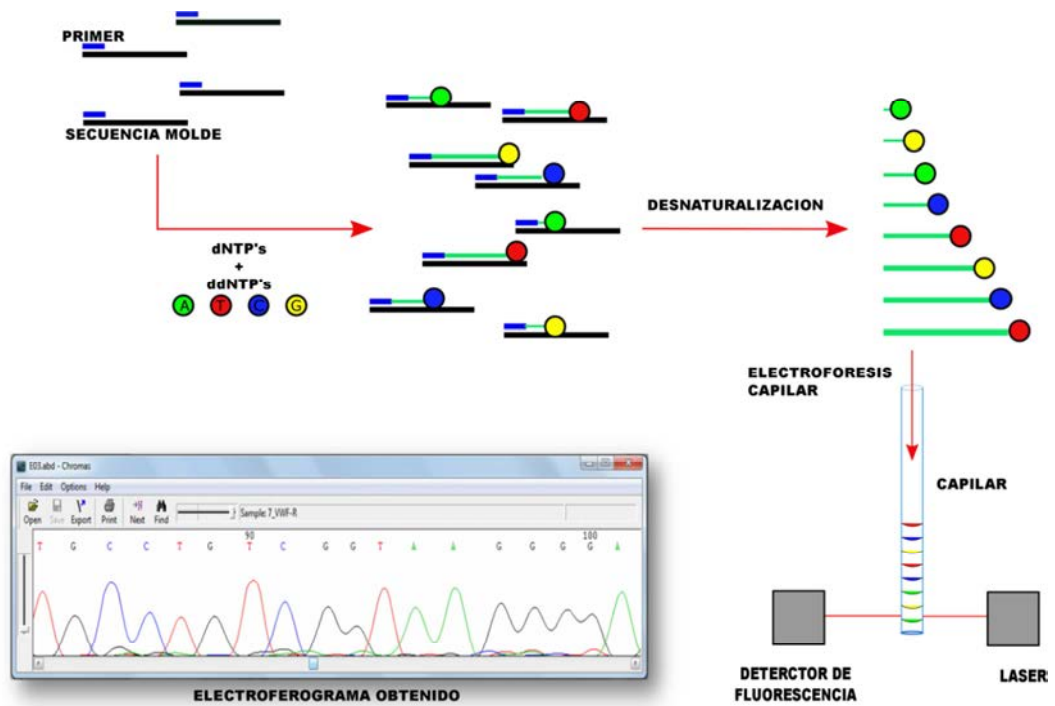


Figura 11. Principio básico de secuenciación directa por electroforesis capilar.



Figura 12. Secuenciador Genetic Analyzer ABI 3500 (Applied Biosystem, USA). Utilizado para las reacciones de secuenciación.

Una vez secuenciadas las muestras de ADN, se determinó su identidad mediante el alineamiento con secuencias de referencia y se identificaron las mutaciones causales de cada una de las enfermedades. Posteriormente, se procedió a desarrollar los métodos de genotipado por medio de la técnica de **Pirosecuenciación**. Para la validación de los métodos desarrollados se utilizaron como controles positivos los animales previamente secuenciados.

Pirosecuenciación

La pirosecuenciación (Ronaghi y *col.*, 1996; 1998) es una técnica de secuenciación, muy útil para genotipificación (Ahmadian y *col.*, 2000; Alderborn y *col.*, 2000), en re-secuenciación de genes asociados a enfermedades (García y *col.*, 2000) y en la determinación de secuencias de ADN con estructuras secundarias intrincadas.

La técnica se basa en la detección del pirofosfato (PPi), liberado durante la incorporación de un nucleótido al ADN, que forma parte de una cascada de reacciones cuyo producto final es la generación de luz visible.

La cascada comienza con la incorporación de un nucleótido por la polimerasa, en la cual se libera un PPi como producto. Luego la enzima ATP sulfúrilasa genera ATP a partir de APS (adenosina 5' fosfosulfato) y del PPi liberado anteriormente. El ATP provee la energía necesaria para la oxidación de la luciferina y la generación de luz. Como la identidad del nucleótido incorporado se conoce, la secuencia molde puede ser determinada fácilmente. Las tres reacciones se llevan a cabo en 3-4

segundos a temperatura ambiente. Un picomol de ADN en una reacción de pirosecuenciación genera 6×10^{11} moléculas de ATP que, a su vez, generan más de 6×10^9 fotones con una longitud de onda de 560 nm. Esta cantidad de luz es fácilmente detectada y se grafica en forma de picos en un pirograma (**Figura 13**).

La genotipificación por **Pirosecuenciación** se llevó a cabo utilizando los primers *forward*, *reverse-M13* y *M13-Biot* previamente diseñados. En cuanto a las condiciones de ciclado (**Anexo 8.1**), la elongación se dividió en dos etapas: la primera de 15 ciclos con una hibridación específica para cada fragmento, utilizando los *primers forward* y *reverse-M13*, y en la segunda etapa se incorporó el *primer* biotinilado M13-Biot con 30 ciclos adicionales y una temperatura de hibridación de 52 °C (**Figura 14**).

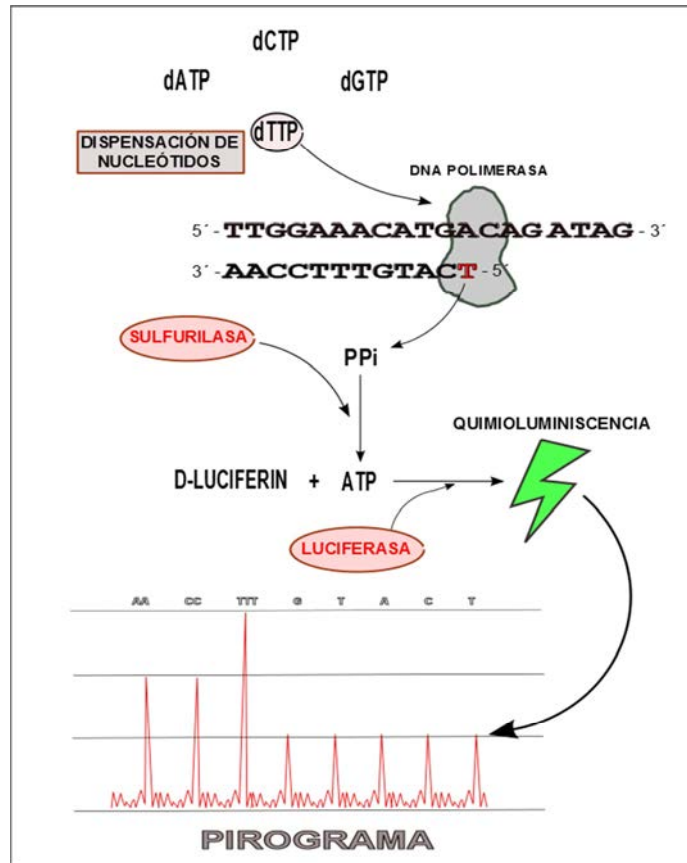


Figura 13. Principio básico de la reacción de Pirosecuenciación.

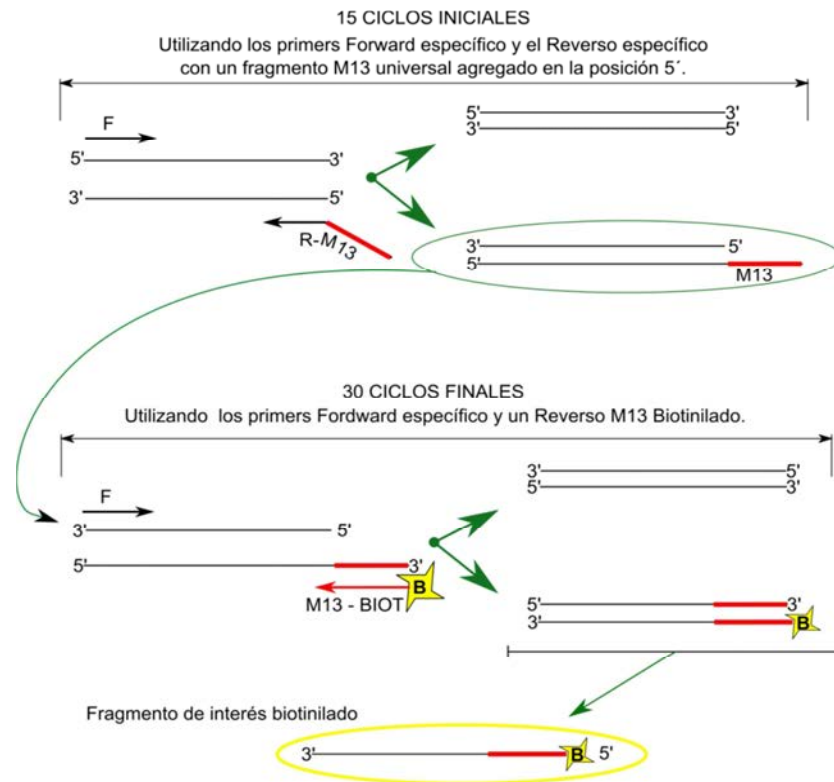


Figura 14. Representación esquemática de la amplificación del fragmento biotinilado para su utilización en la reacción de Pirosecuenciación mediante el primer universal de M13 añadido al primer específico.

Los productos de PCR biotilizados se purificaron utilizando perlas de sefarosa cubiertas con estreptavidina (StreptavidinSepharose TM High Performance, GE Healthcare). Las cadenas de ADN biotiniladas se inmovilizaron en las perlas de sefarosa y se utilizaron como molde para realizar la reacción de pirosecuenciación, incorporando el cebador interno INT-MDR1 (0,5 μ M) y usando el kit comercial *Pyro Gold Reagent Kit* (QIAGEN, Hilden, Alemania) y la *Pyro Mark Prep Workstation* (QIAGEN). Los protocolos para purificar los amplificadores biotilizados fueron los recomendados por el proveedor (**Anexo 8.2**).

Las muestras se tipificaron en un pirosecuenciador PSQTM96 System Instrument (QIAGEN) (**Figura 15**) y los resultados se analizaron con el programa PSQ HS96A (QIAGEN).



Figura 15. Pirosecuenciador PSQTM96 System Instrument (QIAGEN) utilizado para genotipar las muestras de ADN.

Para el caso de la amplificación del fragmento específico para la Atrofia de Retina – **PRCD**, se diseñó un primer específico que se incorporó directamente con la Biotina, ya que luego de probar la amplificación con el fragmento de M13, no se pudo llegar a tener el fragmento amplificado de interés.

Secuenciación Masiva -NGS (NextGenerationSequencing)

Un subset de muestras fueron genotipadas mediante el método de secuenciación masiva (NGS)– target utilizando la versión beta del *kit* NGS *AgriSeqTMTarget* (Thermo Fisher). Esto permitió validar los resultados obtenidos en nuestro laboratorio y evaluarla metodología de NGS. En la mayoría de las estrategias de NGS el proceso se inicia fragmentando el ADN genómico al que se unen oligonucleótidos adaptadores; estas

moléculas son amplificadas clonalmente para la secuenciación en paralelo de millones o billones de lecturas (Peral García y col. 2015) (**Figura 16**).

Las plataformas de secuenciación NGS o secuenciadores de segunda generación son múltiples y variadas, cada una con sus respectivas particularidades, pero todas ellas tienen en común que la detección del ácido nucleico no es aplicable a una única molécula, por lo que se requiere de una previa amplificación del fragmento a secuenciar para poder obtener múltiples lecturas.

En este trabajo se utilizó la tecnología NGS AgriSeqTMTarget, que como se basa en la técnica de NGS target, a diferencia de las metodologías originales de NGS, en esta no se parte del ADN genómico fragmentado, sino que se utiliza una química de PCR multiplex altamente eficiente en la que cientos y/o miles de marcadores target pueden ser amplificados uniformemente en una sola reacción. Las librerías de amplicones pueden luego tener un código de barras y agruparse para la secuenciación simultánea de cientos de muestras en una única corrida de un equipo de NGS de Ion Torrent o similar (Thermo Fisher).

Agri Seq AgriSeqTMTarget NGS es capaz de generar hasta 1,6 millones de genotipos por día a partir de datos NGS de alta calidad (www.thermofisher.com/).

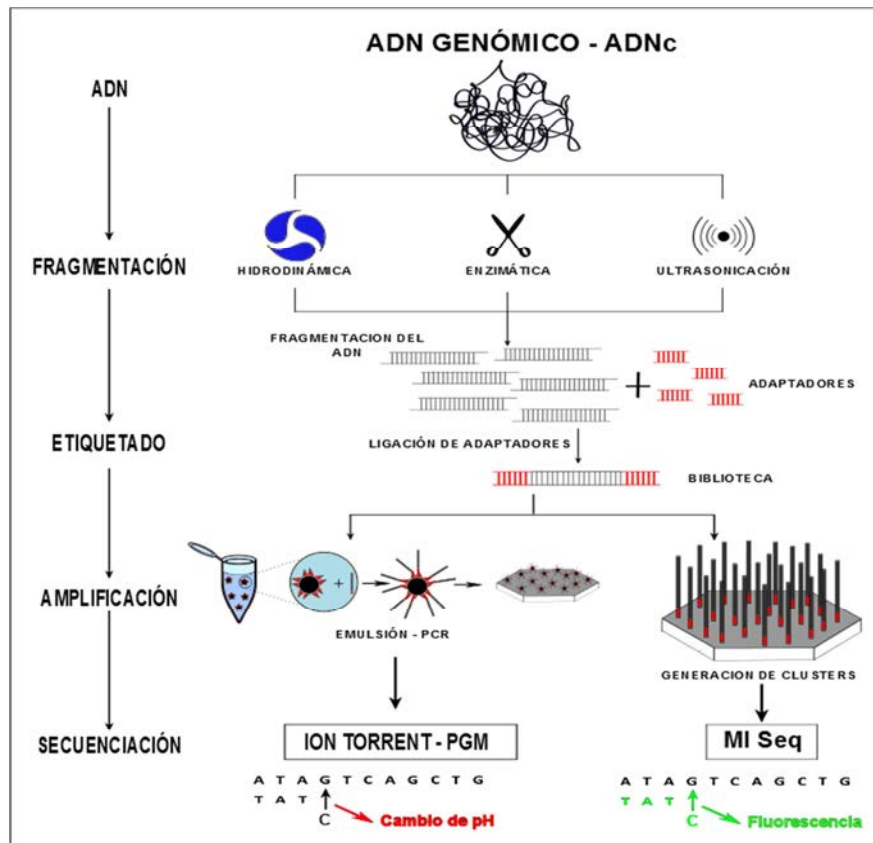


Figura 16. Esquema del mecanismo de secuenciación masiva (NGS) utilizado por las plataformas Ion Torrent (Thermo Fisher) y MySeq (Illumina) (Peral Garcia y col., 2015).

Lectura e interpretación de los datos obtenidos de la secuenciación capilar, pirosecuenciación y NGS

Las secuencias de ADN obtenidas con el secuenciador Secuenciador Genetic Analyzer ABI 3500 (Applied Biosystem, USA), se alinearon y corrigieron utilizando el software CLUSTAL-X 2.1 (Larkin *et al.*, 2007) y en comparación directa con las secuencias reportadas en Genbank. Para el análisis individual de las secuencias en los sitios específicos de los polimorfismos causales de las enfermedades se utilizó el software Chromas Lite v2.1.1 (Technelysium, http://technelysium.com.au/?page_id=13).

Para tipificar los SNP (Polimorfismo de nucleótido simple) de las enfermedades se diseñó un método basado en la técnica de Pirosecuenciación utilizando el Pirosecuenciador PSQ 96MA y los resultados se analizaron utilizando el software Pyromark ID 1.0, que utiliza el propio Pirosecuenciador.

Las secuencias fastq fueron analizadas por calidad utilizando el programa Galaxy (Heng Li y col. 2009) y posteriormente se crearon los archivos BAM y luego de alinearon con la secuencia del genoma canino. Se identificaron los polimorfismos y finalmente se exportó a un archivo .VCF de los SNP detectados. Este procedimiento fue realizado en colaboración con los laboratorios de Desarrollo Agrogenómicos de Thermo Fisher Scientific (Austin, TX, USA)

Análisis poblacional.

Las frecuencias alélicas para cada mutación, dentro de las poblaciones analizadas, se calcularon con el software GENEPOP 4.0 (Roussety *col.*, 1997; Rousset, 2007). La H_o y H_e para cada locus se estimaron de acuerdo a Nei (1978) usando el software de análisis genéticos poblacionales ARLEQUIN 3.5 (Schneider y *col.*, 2000). Las posibles desviaciones del equilibrio de Hardy-Weinberg (HWE) se estimaron para cada locus y subpoblación mediante el test exacto de Fisher incluido en el programa GENEPOP 4.

La asociación entre la frecuencia del alelo mutado y variables como sexo y color de capa, se evaluó utilizando el un modelo clásico de estudio caso-control. El test exacto de Fisher y Odd Ratio se calcularon por comparación de las frecuencias alélicas entre los grupos. Los valores de $p < 0,05$ se consideraron significativos. El análisis estadístico se llevó a cabo utilizando el paquete de R epitools (<http://www.r-project.org/>).

Para la construcción de los pedigríes se utilizó el programa GenoPro® 2011 Version 2.5.3.8 Copyright © 1998-2011 (www.genopro.com).

RESULTADOS

Con el fin de evaluar la prevalencia de tres enfermedades de origen genético (MDR1/ABCB1, EVW de Tipo I y PRCD-PRA) y de la de sus alelos causales en poblaciones locales de razas caninas, como objetivo principal, se propusieron tres objetivos específicos, los cuales consistieron en primera instancia y sobre la base de la bibliografía encontrada confirmar la mutación causal de las enfermedades, en las poblaciones locales.

Dicha tarea se llevó a cabo mediante la secuenciación de las regiones de ADN que incluyen las mutaciones causales reportadas, en animales de genotipo conocido o que presentaron signos clínicos correspondientes a la enfermedad en cuestión. Una vez confirmada la mutación y la región donde se encuentra se pasó al siguiente objetivo que consistió en desarrollar un método de genotipificación mediante la técnica de Pirosecuenciación.

Finalmente, las técnicas de Genotipado basadas en pirosecuenciación y sus resultados fueron validados y comparados con los obtenidos mediante un método de tipificación de enfermedades genéticas basado en NGS Target.

Para finalizar, habiendo cumplido con las etapas de desarrollo de un método de detección de las enfermedades se comenzó a tipificar a los animales que pertenecían a las razas de riesgo para dichas afecciones en las poblaciones locales que se encuentren registrados dentro del circuito oficial cinológico y cumplan con la condición de que en lo posible no sean perros emparentados entre sí.

Atrofia progresiva de Retina, Degeneración Progresiva de Conos y Bastones (APR – PRCD):

Amplificado del fragmento

El primer paso para el estudio de la enfermedad APR-PRCD en las poblaciones locales de las razas Labrador Retriever y Caniche Toy consistió en el análisis de las secuencias de ADN disponibles en la base de datos pública GenBank (NCBI Reference Sequence: NM_001097560.2 - Cromosoma 9 – Exón 27) y el diseño de cebadores para la amplificación de la región que incluye la mutación causal. Como se observa en la figura 15, el uso de los cebadores diseñados permitió amplificar un fragmento del tamaño esperado (80 pb) (**Figura 17**).

Secuenciación

Posteriormente, el ADN de un sub-set de animales fueron amplificados y los productos de amplificación se secuenciaron en un secuenciador de ADN de tecnología capilar Secuenciador Genetic Analyzer ABI 3500 (Applied Biosystem, USA) obteniéndose los electroferogramas correspondientes. De esta manera se confirmó la presencia de la mutación causal de la Degeneración Progresiva de Conos y Bastones previamente reportada en las poblaciones locales de Labradorres y Caniche Toy. Además, se pudieron identificar animales con los tres posibles genotipos: homocigota para el alelo normal G (G/G), heterocigota (G/A) y homocigota para el alelo mutado A (A/A) (**Figura 18a-c**), lo que fueron posteriormente utilizados como controles positivos.

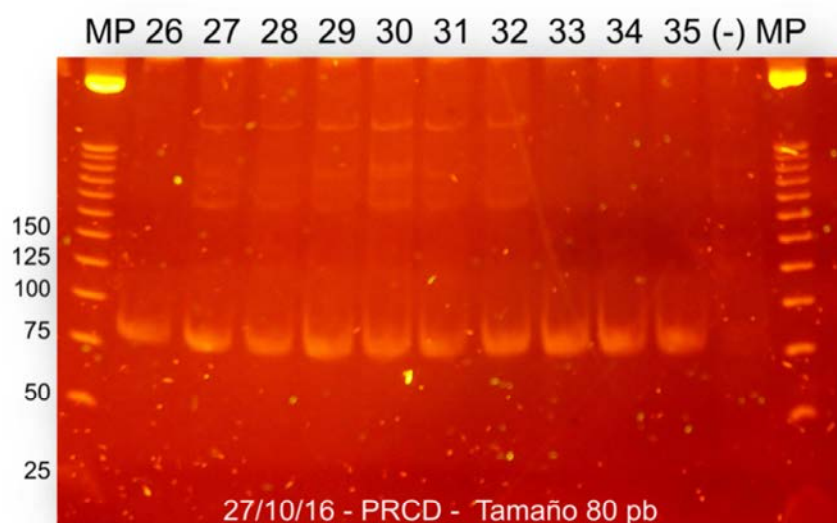


Figura 17. Gel de poliacrilamida 6%. Fragmento amplificado por PCR del gen PRCD de 80 pares de bases (pb). MP: Marcador de peso molecular (Marcador de ADN – INBIO HIGHWAY (100 pb), (-): negativo.

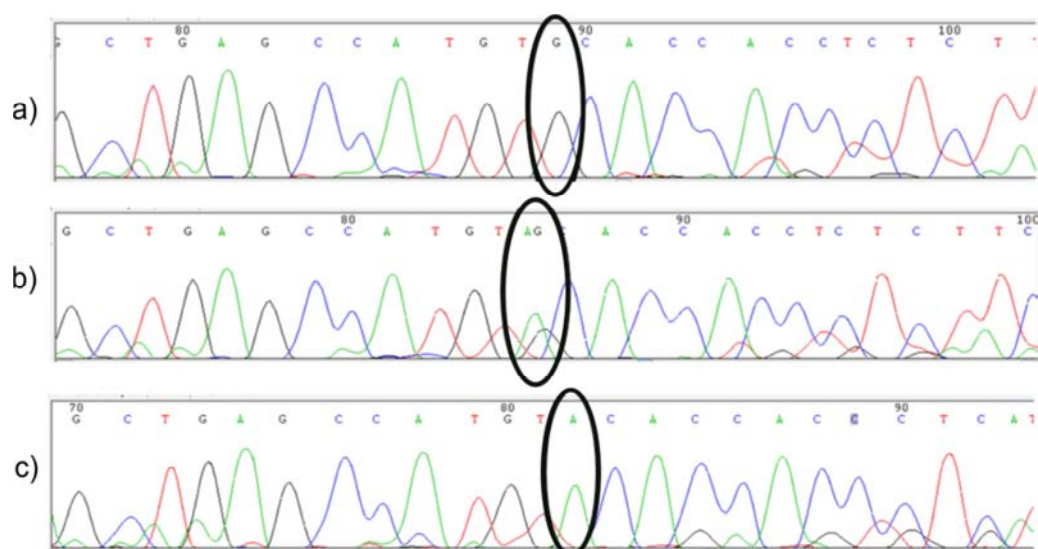


Figura 18. Electroferogramas obtenidos por secuenciación del fragmento del gen PRCD, a) de un individuo con genotipo homocigota para el alelo normal G; b) genotipo Heterocigota G/A; c) genotipo Homocigoto para el alelo mutado A.

Genotipado por Pirosecuenciación.

Posteriormente, se diseñaron los métodos por Pirosecuenciación, se tipificaron los animales que se habían secuenciado, de esta forma se obtuvieron los pirogramas correspondientes a los tres genotipos esperados (**Figura 19 a-c**).

Los resultados obtenidos mostraron una concordancia entre los genotipos obtenidos en los animales tipificados por ambos métodos (secuenciación sanger y pirosecuenciación).

El paso siguiente consistió en la genotipificación de la mutación G1298A en todos los animales muestreados: 61 perros de raza Labrador Retriever, 67 de la raza Caniche Toy. Además, se analizaron muestras de 10 perros mestizos, los cuales se tipificaron para dicha mutación.

Genotipado por NGS target.

Finalmente, se utilizó la técnica de NGS target para tipificar la mutación G1298A en un subset de animales que ya se habían tipificados por las técnicas anteriores. Este proceso sirvió como un nuevo método de comprobación de la eficacia de la técnica desarrollada.

Los resultados obtenidos por esta técnica mostraron una gran coincidencia entre la tipificación realizada por pirosecuenciación y la técnica de NGS target. De los 19 animales de la raza Caniche Toy de genotipo conocido, se pudo observar una sola discordancia en un perro donde el genotipo que se había obtenido por pirosecuenciación era heterocigota, mientras que el informado por NGS fue homocigota para el alelo mutado (**Tabla 10**).

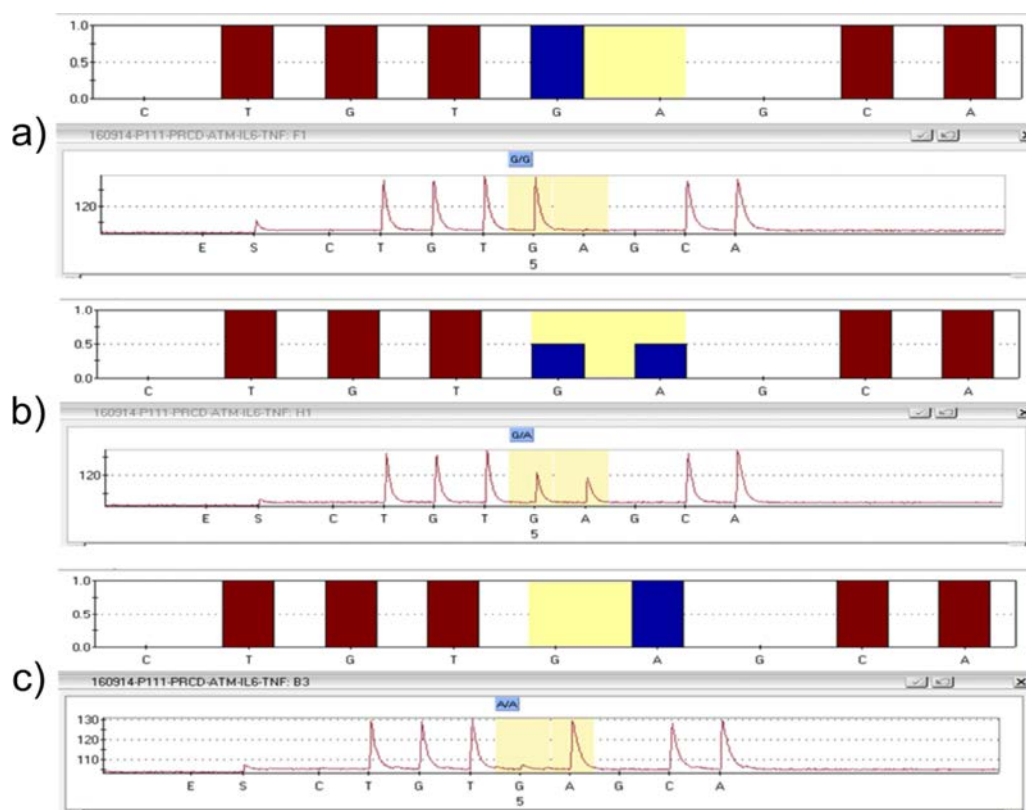


Figura 19. Pirogramas obtenidos por pirosecuenciación del fragmento del gen PRCD, a) genotipo homocigota para el alelo normal G; b) genotipo heterocigota (G/A); c) genotipo homocigota para el alelo mutado A.

Tabla 10. Genotipos obtenidos por las técnicas de pirosecuenciación y NGS target de 19 perros raza Caniche Toy. Homocigota normal (G/G), Heterocigota (G/A); Homocigota mutado (A/A). “G” alelo normal, “A” alelo mutado. Sombreado en gris se observa el individuo en el cual se presentó la diferencia de genotipos. ./, = no determinado.

Caniche Toy - PRCD		
	NGS	PIRO
1	G/A	G/A
2	A/A	G/A
3	A/A	A/A
4	G/G	G/G
5	G/G	G/G
6	G/A	G/A
7	G/A	G/A
8	./	A/A
9	./	G/G
10	./	G/G
11	G/G	G/G
12	G/G	G/G
13	G/G	G/G
14	G/G	G/G
15	G/A	G/A
16	./	G/A
17	G/A	G/A
18	G/A	G/A
19	G/G	G/G

Análisis estadístico

En cuanto al total de los animales analizados, la frecuencia de la mutación G1298A fue de 0,13. En el caso de los Labradores, la frecuencia del alelo mutado fue de 0,06. En el caso de los Caniche Toy, se encontró una frecuencia mucho mayor, siendo $q = 0,19$. Cabe destacar que entre los animales mestizos no se encontró el alelo de la mutación G1298A. La frecuencia de animales homocigotas para el alelo mutado (A/A) encontrada en la raza Labradores, fue de 0, con una H_o de 0,07 a diferencia de lo observado en la raza Caniche Toy donde la prevalencia de la enfermedad fue de 0,04 y una H_o de 0,19. Los animales en los que se correspondía el genotipo mutado con los signos de ceguera, en la raza Labrador fue de cero (no se encontraron perros homocigotas mutados); y en la raza Caniche Toy de los 7 que presentaron signos clínicos, 3 presentaron el genotipo sano (G/G), 2 portadores (G/A) y solamente 2 el genotipo enfermo (A/A). La estimación del EHW en la población total y en ambas razas analizadas por separado (Labradores y Caniche Toys) no evidenció un desvío significativo con respecto a las proporciones teóricas esperadas para el equilibrio. (**Tabla 11**)

La asociación entre sexo y alelo mutado en ambas razas resultó no presentar diferencias significativas mediante el test exacto de Fisher para los Labradores Retriever, a diferencia de los Caniche Toy que si presentaron diferencias ($p=0,022$) y un Odd ratio de 3:1, las hembras tienen 3 veces más probabilidad de tener el alelo mutado que los machos. (**Figura 20**)

De los animales muestreados y genotipados de los que se obtuvo acceso a su historia clínica, 10 de ellos tenían signos de Atrofia de Retina en sus electroretinografías. Solamente en dos, el genotipo A/A (homocigota para el alelo mutado) coincidió con la ERG positiva. También se observó que 3 animales heterocigotas (G/A) y 5 homocigotas (G/G) para el alelo sano, presentaron signos clínicos con ERG positivas.

Tabla 11. Frecuencias genotípicas y génicas; “G” alelo norma y “A” alelo mutado, p y q respectivamente. HWE = Equilibrio de Hardy – Weinberg. h_e : heterocigosidad esperada; h_o : heterocigosidad observada

Raza	n	Frecuencias Genotípicas			Frecuencias Génicas		HWE	h_e	h_o
		G/G	G/A	A/A	p	q	P value		
Labradores	61	0,88	0,12	0	0,94	0,06	1	0,06	0,07
Caniches	67	0,67	0,29	0,04	0,81	0,19	0,68	0,20	0,19
Total	128	0,77	0,2	0,03	0,87	0,13	0,41	0,28	0,26
Mestizos	10	1	0	0	1	0	-	-	-

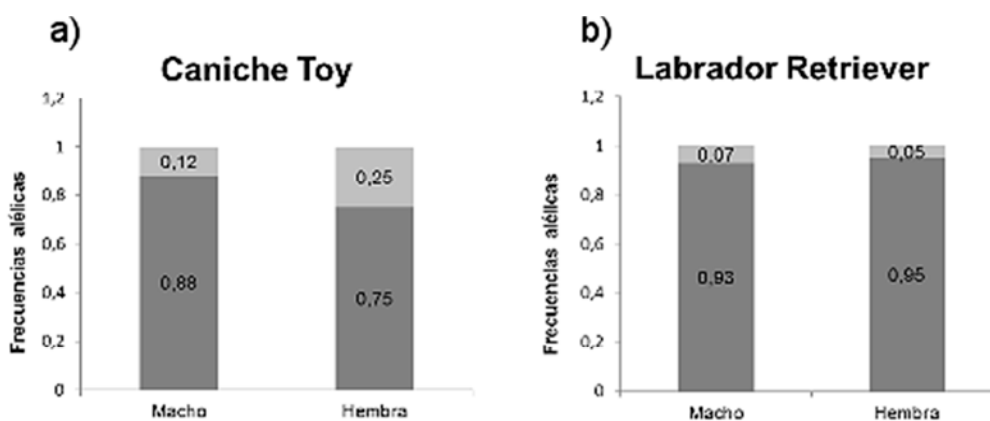


Figura 20. Frecuencias génicas de los animales analizados teniendo en cuenta el sexo en Labradores y en Caniche Toy. p = frecuencia alélica del alelo normal (G), y q frecuencia alélica del alelo mutado (A).

Enfermedad de Von Willebrand tipo 1- EVW 1

Amplificado del fragmento

Para amplificar el fragmento del gen vWF donde se encuentra la mutación causal de la enfermedad de von Willebrand se realizó en primer lugar el análisis de las secuencias de ADN disponibles en la base de datos pública GenBank (NCBI Reference Sequence: NM_001002932.1 - Cromosoma 27 – Exón 43), luego se diseñaron los cebadores (**Tabla 9**) y finalmente se realizó la amplificación del fragmento por PCR, obteniéndose un producto de PCR de 240 pb. Análisis posteriores confirmaron la identidad de la secuencia amplificada y la presencia del sitio donde ocurre la mutación c.7437 G> A (**Figura 21**).

Inicialmente, se utilizaron perros de raza Doberman Pinscher, algunos de los cuales presentaban signos clínicos posiblemente debidos a esta enfermedad, y algunos otros que no.

El siguiente paso consistió en confirmar la identidad del fragmento obtenido mediante secuenciación capilar.

Secuenciación

Se secuenciaron los productos de amplificación en un sub-set de muestras y los resultados obtenidos se compararon con las secuencias de referencia, lo que permitió confirmar la identidad de la secuencia amplificada. Además, mediante este análisis se pudo detectar la presencia de la mutación e identificar animales con los tres genotipos posibles en las poblaciones locales de la raza Doberman (**Figura 22**). Posteriormente, estas muestras fueron utilizadas como controles positivos para los subsecuentes análisis.

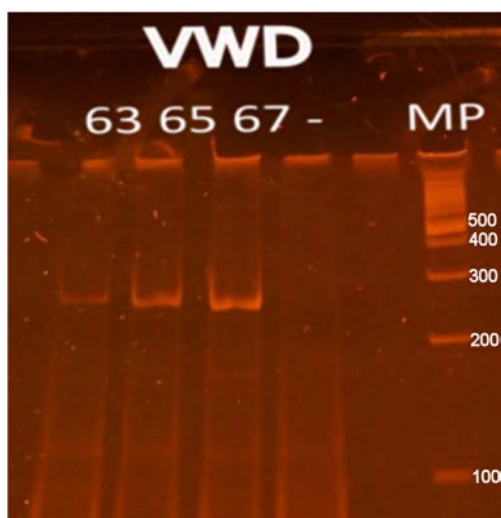


Figura 21. Gel de poliacrilamida 6% donde se corrieron amplificados del gen VWF por PCR. Positivo (+), Negativo (-). MP = marcador de peso molecular INBIO HIGHWAY (100 pb).

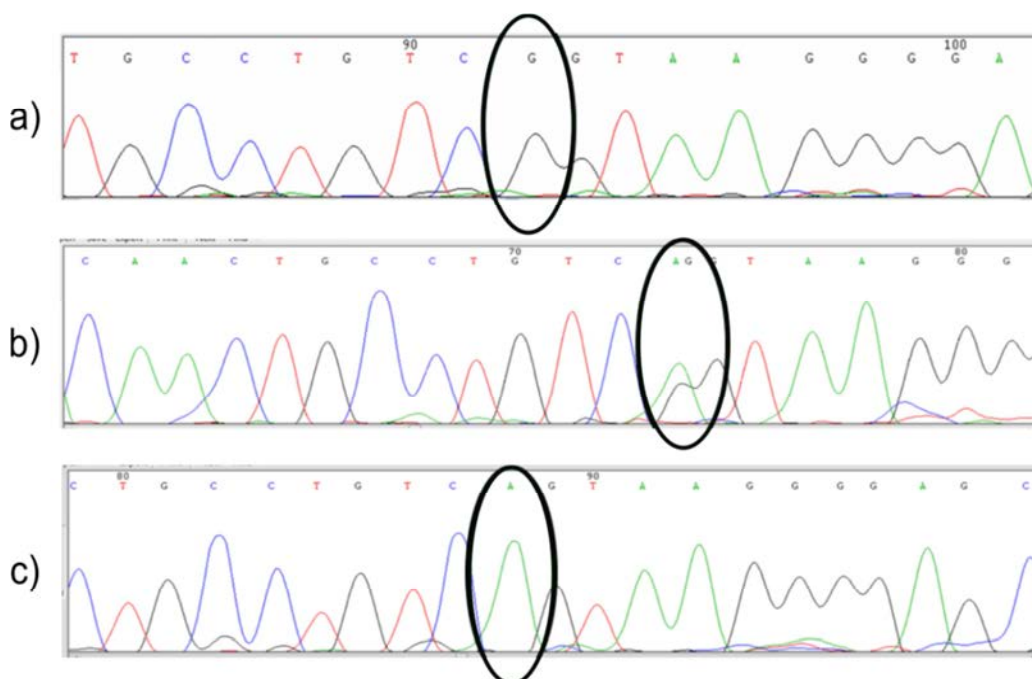


Figura 22. Electroferogramas obtenidos por secuenciación capilar del fragmento del gen vWF donde se observa el sitio de la mutación c.7437 G> A. a) individuo con genotipo homocigota para el alelo normal G; b) individuo con genotipo heterocigota G/A; c) individuo con genotipo homocigoto para el alelo mutado A.

Genotipado por Pirosecuenciación

El paso siguiente consistió en el desarrollo de un método de pirosecuenciación donde se tipificaron todos los animales muestreados. En la figura 23 se muestran los pirogramas obtenidos para los tres genotipos de la mutación c.7437G>A posibles. Nuevamente, los resultados obtenidos por las dos técnicas (secuenciación y pirosecuenciación) resultaron coincidentes en el 100% de los animales analizados.

Genotipado por NGS

Finalmente, se utilizó la técnica de NGS target para tipificar la mutación c.7437 G> A en un sub-set de los animales que ya se habían tipificados por la técnica de pirosecuenciación. Este proceso sirvió como un nuevo método de comprobación de la eficacia de la técnica desarrollada.

Los resultados obtenidos por esta técnica mostraron una gran coincidencia entre la tipificación realizada por pirosecuenciación y la técnica de NGS target. Se enviaron 38 animales de la raza Doberman Pinscher de genotipo conocido.

Se pudo observar que en tres muestras hubo una discordancia en perros donde el genotipo que se había obtenido por pirosecuenciación era el de un heterocigota, mientras que el informado por NGS fue homocigota para el alelo mutado (**Tabla 12**).

Las muestras analizadas por esta técnica para la enfermedad de von Willebrand tipo 1, también fueron genotipificadas para las otras variantes conocidas de esta enfermedad, EvW tipo 2, tipo 3 y tipo 3_2. En todos los casos analizados no se encontró la mutación causal para estas variantes de la enfermedad. Todos los individuos presentaron el genotipo homocigota para los alelos sanos (**Tabla 12**).

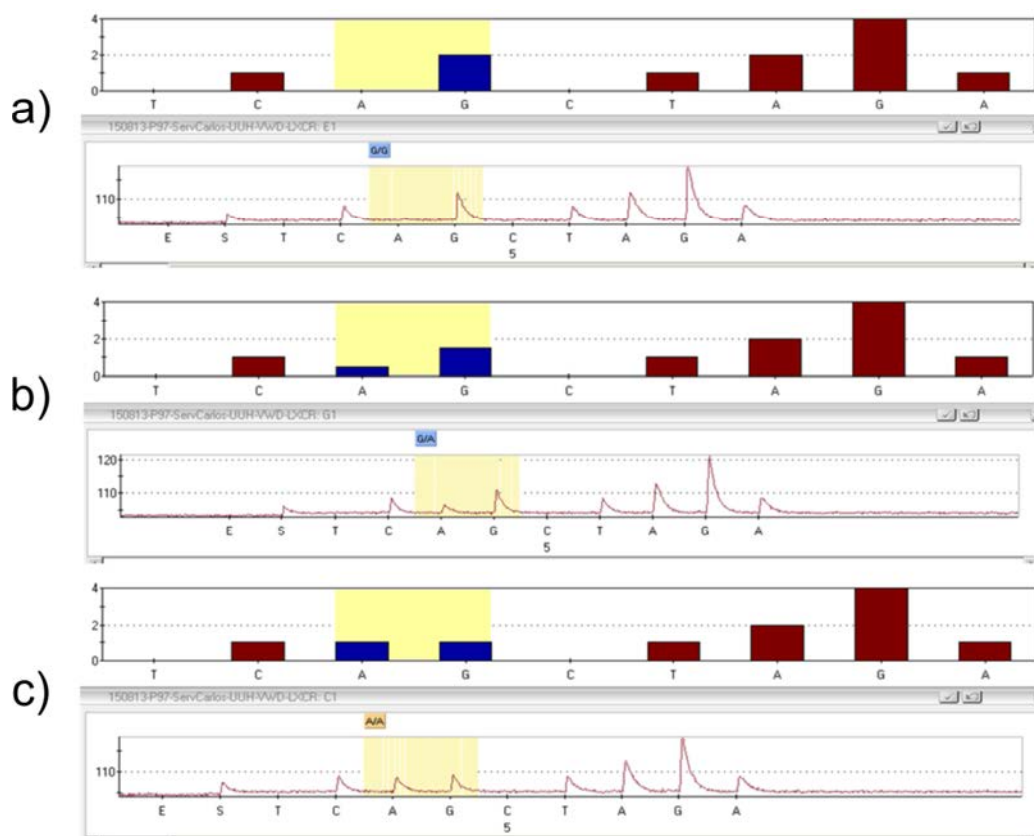


Figura 23. Genotipos obtenidos por pirosecuenciación para la mutación c.7437 G> A del gen vWF. Homocigota para el alelo normal G (a); heterocigota G/A (b); homocigota para el alelo mutado A (c).

Tabla 12. Comparación de los genotipos obtenidos por las técnicas de pirosecuenciación y NGS para la mutación de EvW tipo 1, y los resultados obtenidos en los mismos animales de la raza Doberman pinscher para las EvW tipo 2, 3 y 3_2. En gris se marcan los individuos en los que se encontró una discordancia entre las técnicas comparadas

Doberman Pinscher - EvW					
M	NGS				PIRO
	EvW3_2	EvW3	EvW2	EvW1	EvW1
1	C/C	G/G	A/A	G/A	G/A
2	C/C	G/G	A/A	G/A	G/A
3	C/C	G/G	A/A	A/A	A/A
4	C/C	G/G	A/A	G/A	G/A
5	C/C	G/G	A/A	G/G	G/G
6	C/C	G/G	A/A	G/A	G/A
7	C/C	G/G	A/A	A/A	A/A
8	C/C	G/G	A/A	G/A	G/A
9	C/C	G/G	A/A	G/A	G/A
10	C/C	G/G	A/A	G/A	G/A
11	C/C	G/G	A/A	G/A	G/A
12	C/C	G/G	A/A	G/A	G/A
13	C/C	G/G	A/A	A/A	G/A
14	C/C	G/G	A/A	G/G	G/G
15	C/C	G/G	A/A	G/G	G/G
16	C/C	G/G	A/A	G/A	G/A
17	C/C	G/G	A/A	G/A	G/A
18	C/C	G/G	A/A	A/A	G/A
19	C/C	G/G	A/A	G/A	G/A
20	C/C	G/G	A/A	G/G	G/G
21	C/C	G/G	A/A	G/G	G/G
22	C/C	G/G	A/A	A/A	A/A
23	C/C	G/G	A/A	G/A	G/A
24	C/C	G/G	A/A	G/A	G/A
25	C/C	G/G	A/A	A/A	G/A
26	C/C	G/G	A/A	G/A	G/A
27	C/C	G/G	A/A	G/G	G/G
28	C/C	G/G	A/A	G/A	G/A
29	./.	./.	./.	./.	G/G
30	C/C	G/G	A/A	G/G	G/G
31	C/C	G/G	A/A	A/A	A/A
32	C/C	G/G	A/A	G/G	G/G
33	C/C	G/G	A/A	G/A	G/A
34	C/C	G/G	A/A	A/A	A/A
35	C/C	G/G	A/A	G/A	G/A
36	C/C	G/G	A/A	G/A	G/A
37	C/C	G/G	A/A	G/A	G/A
38	C/C	G/G	A/A	G/A	G/A

Análisis estadístico

Del total de los animales muestreados se pudieron establecer tres grupos en base a los datos de parentesco obtenidos de cada perro. Un primer grupo de animales que no mantenían ningún tipo de relación entre ellos, y dos grupos en los que sus integrantes tenían algún tipo de parentesco. Estos dos grupos conformaron las denominadas familia 1 y familia 2. También se pudo observar que estos dos grupos presentaban un individuo en común.

Se calcularon las frecuencias génicas y genotípicas, para la población total, para las dos familias y para los animales no relacionados. En todos estos grupos se pudo observar que las proporciones genotípicas no se desviaban de la distribución teórica. (**Tabla 13**).

La frecuencia observada de la mutación para la EvW tipo1 en el total de los animales analizados fue de 0,4. En los grupos de perros que tenían algún tipo de relación entre sus integrantes fue de 0,43 y 0,58 para la familia 1 y el 2, respectivamente. En el caso de los perros que no tenían relación entre ellos se encontró una frecuencia un poco más baja, de 0,35.

El análisis de la diferenciación genética de las frecuencias génicas entre pares de grupos no mostró diferencias significativas entre ellos. ($p > 0,05$).

Se analizaron las frecuencias alélicas diferenciando a los individuos por sexo (**Figura 24a**), y teniendo en cuenta el color de capa, ya sean negro/fuego o marrón/fuego (**Figura 24b**), estos resultados no mostraron diferencias significativas teniendo en cuenta estas variables ($p > 0,05$).

Tabla 13. Se detallan las frecuencias génicas y genotípicas de la mutación c.7437G> A obtenidas en la población total, en los dos grupos de animales relacionados entre sí y en los animales no relacionados. “G” alelo norma y “A” alelo mutado, denominados p y q, respectivamente. HWE = Equilibrio de Hardy Weinberg.

	n	Frecuencias Genotípicas			F. Génicas		HWE	He	Ho
		G/G	G/A	A/A	p	q	valor de p		
Familia 1	34	0,26	0,62	0,12	0,57	0,43	0,16	0,17	0,22
Familia 2	13	0,15	0,54	0,31	0,42	0,58	1	0,5	0,53
No relacionados	64	0,42	0,43	0,15	0,64	0,36	0,58	0,29	0,27
Población Total	111	0,34	0,5	0,15	0,59	0,41	0,69	0,54	0,56

La frecuencia encontrada de animales homocigota para el alelo mutado en la población total de Doberman fue de 0.15, muy similar a las encontradas en el grupo de animales no relacionados y al de la denominada familia 1, 0.15 y 0.12 respectivamente.

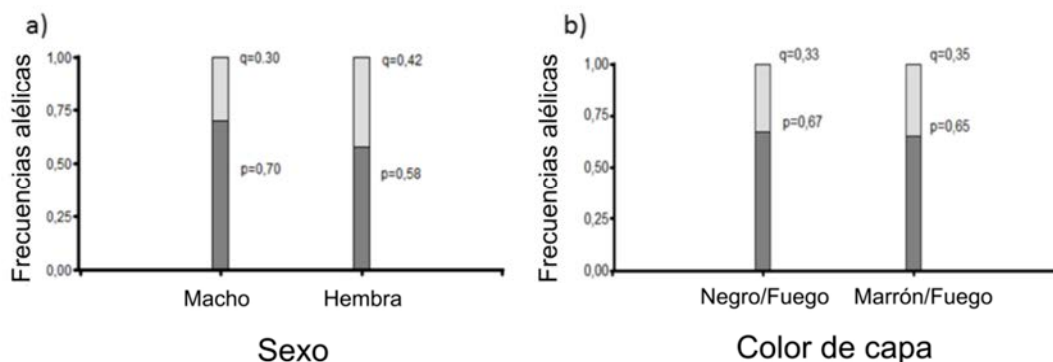


Figura 24. Frecuencias génicas de los animales analizados teniendo en cuenta el sexo (a) y el color de capa (b). p = frecuencia alélica del alelo normal (G), y q frecuencia alélica del alelo mutado (A).

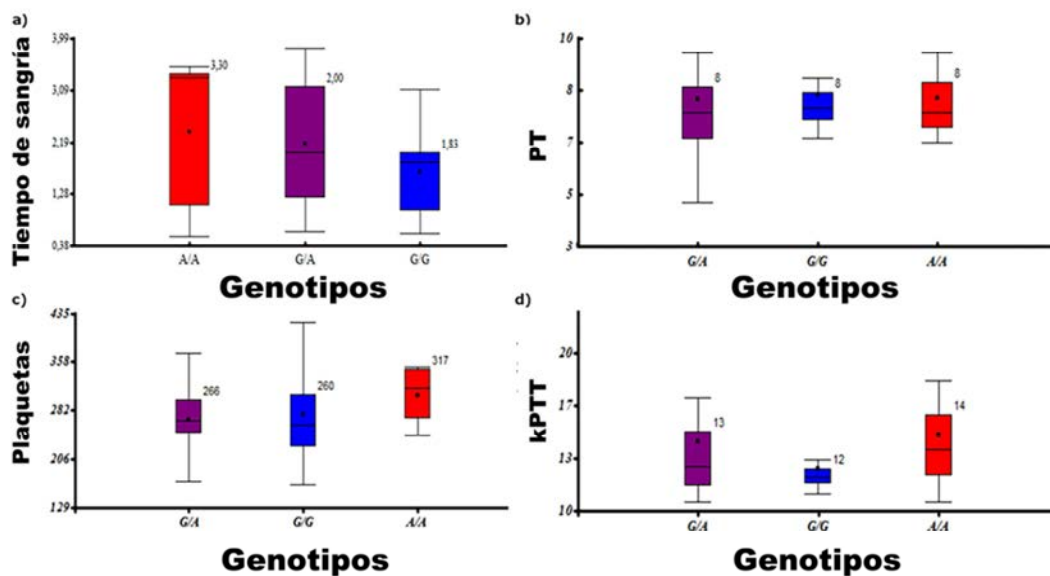


Figura 25. Relación entre genotipos y los valores obtenidos de: a) tiempo de sangría, b) tiempo de protrombina (PT), c) recuento de plaquetas, y d) tiempo de tromboplastina parcial activada (kPTT).

Análisis de signos clínicos

Se analizaron conjuntamente los datos de historias clínicas de 41 animales genotipados y los datos genéticos. Este análisis se llevó a cabo mediante dos estrategias, análisis de asociación y de pedigríes. Los resultados obtenidos mostraron que 3 de 5 perros homocigotos A/A no tenían evidencia de signos clínicos; todos los animales homocigotos G/G eran normales. Además, solo 6 de 27 animales heterocigotos mostraron signos clínicos (**Tabla 14**).

En cuanto al análisis de los hemogramas, el recuento de plaquetas y los resultados de la prueba de coagulación, PT y kPTT, los valores obtenidos estaban dentro de los rangos normales en los 41 animales (**Tabla 15**) y no presentaba relación con el genotipo (**Figura 25 a-d**).

Tabla 14. Presencia o ausencia de signos clínicos teniendo en cuenta los genotipos posibles para la mutación c.7437G>A. G/G (homocigota para el alelo normal), G/A (heterocigota), A/A (homocigota para el alelo mutado), \bar{X} = promedio tiempo de sangría.

Genotipo	Signos +	Signos -	\bar{X}
G/G	0	9	1,66
G/A	6	21	2
A/A	2	3	2,36

Por último, la determinación de las diferencias en los tiempos de sangría (BT) entre los 3 genotipos de la mutación c.7437G> A estimada mediante ANOVA de un factor mostró que, aunque G/A y A/A tuvieron tiempos de hemorragia promedios más altos que G/G, estos valores no fueron estadísticamente significativos ($p = 0,403$). (**Tabla 15**).

Tabla 15. Resultados de los análisis de hematocrito (Hem), conteo de plaquetas (plat), y test de coagulación: tiempo de sangría BT, tiempo de Tromboplastina parcial activada (KPTT), tiempo de Protrombina (PT) obtenido para cada animal genotipado. Sexo (SX) y Genotipo.

N°	SX	Genotipo	BT (min)	PT (sec)	KPTT (sec)	Plat. (ul/x10 ⁹)	
						150-500	Hem(%) 35 a 55
1	M	G/A	1,83	9	14	395	42
2	M	G/G	0,76	9	13	190	43
3	M	A/A	1,08	7	13	317	40
4	M	G/G	0,6	8	12	421	44
5	F	G/A	0,89	7	15	310	35
6	F	A/A	0,55	8	19	350	41
7	F	G/A	0,91	7	12	230	38
8	M	G/A	1,5	7	12	278	40
9	F	G/A	0,64	7	13	260	46
10	F	G/A	0,8	7	11	278	44
11	F	G/G	1,38	8	14	282	46
12	M	G/A	3,83	7	13	270	44
13	F	G/A	1,95	6	14	347	47
14	M	G/A	1,22	5	13	252	55
15	F	A/A	3,33	7	15	243	45
16	F	G/A	2,83	7	14	261	33
17	M	G/A	1,36	9	12	259	33
18	F	G/A	3,83	8	12	372	52
19	M	G/G	1,83	7	12	307	45
20	F	G/G	2	8	13	165	48
21	F	G/A	3,16	8	12	274	52
22	M	G/A	3,33	8	12	258	45
23	F	G/A	3,2	8	15	236	50
24	M	G/A	1,42	9	16	337	43
25	F	G/A	1	8	17	300	44
26	F	G/G	2,3	8	13	385	37
27	M	G/G	3	8	14	260	47
28	F	G/A	2,33	9	14	250	47
29	F	A/A	3,37	10	12	347	46
30	F	G/A	2	9	20	247	52
31	F	G/A	0,88	10	13	150	50
32	F	G/A	3,16	9	22	171	56
33	F	G/A	2,83	7	22	n	n
34	F	G/A	3,36	9	12	360	49
35	F	A/A	3,53	8	15	269	49
36	F	G/A	1,5	8	13	143	42
37	F	G/G	2	9	12	225	39
38	F	G/G	1	8	13	257	51
39	F	G/A	3,66	8	17	187	48
40	F	G/A	1,37	9	16	270	41
41	F	G/A	2,83	10	13	270	51

A partir de los datos obtenidos sobre las relaciones de parentesco de los individuos muestreados, se reconstruyeron dos pedigríes con los animales que se agruparon en las familias 1 y 2 (**Figura 26**). Se analizaron conjuntamente teniendo en cuenta que ambas familias presentaban un ancestro común con genotipo A/A.

Los datos de genotipado de estos pedigríes fueron consistentes con herencia mendeliana. En este sentido, todos los individuos con genotipo G/A y A/A tenían padres que portaban el alelo mutado. Además, como se mencionó anteriormente ninguno de los animales G/G mostró signos o resultados de laboratorio consistentes con una coagulopatía.

Como se esperaba, la presencia de un ancestro común homocigótico para el alelo mutante explicó que las frecuencias del alelo A sean más altas en estas familias en relación con los animales no relacionados.

De acuerdo con los registros clínicos y las mediciones del Tiempo de Sangría, los resultados mostraron que solo los animales con al menos un alelo mutado tenía signos clínicos, lo que sería compatible con un modo de herencia de **tipo Dominante con Penetrancia Incompleta**.

Como se mencionó anteriormente, la enfermedad de von Willebrand se presenta en tres tipos. Todos los animales que se analizaron para la variante tipo 1 mediante la técnica de NGS, también fueron tipificados para las mutaciones causales de los tipos 2 y 3 de la enfermedad. Los

resultados obtenidos mostraron que ninguno de los perros Doberman genotipados presentaba alelos mutados para esas otras variantes.

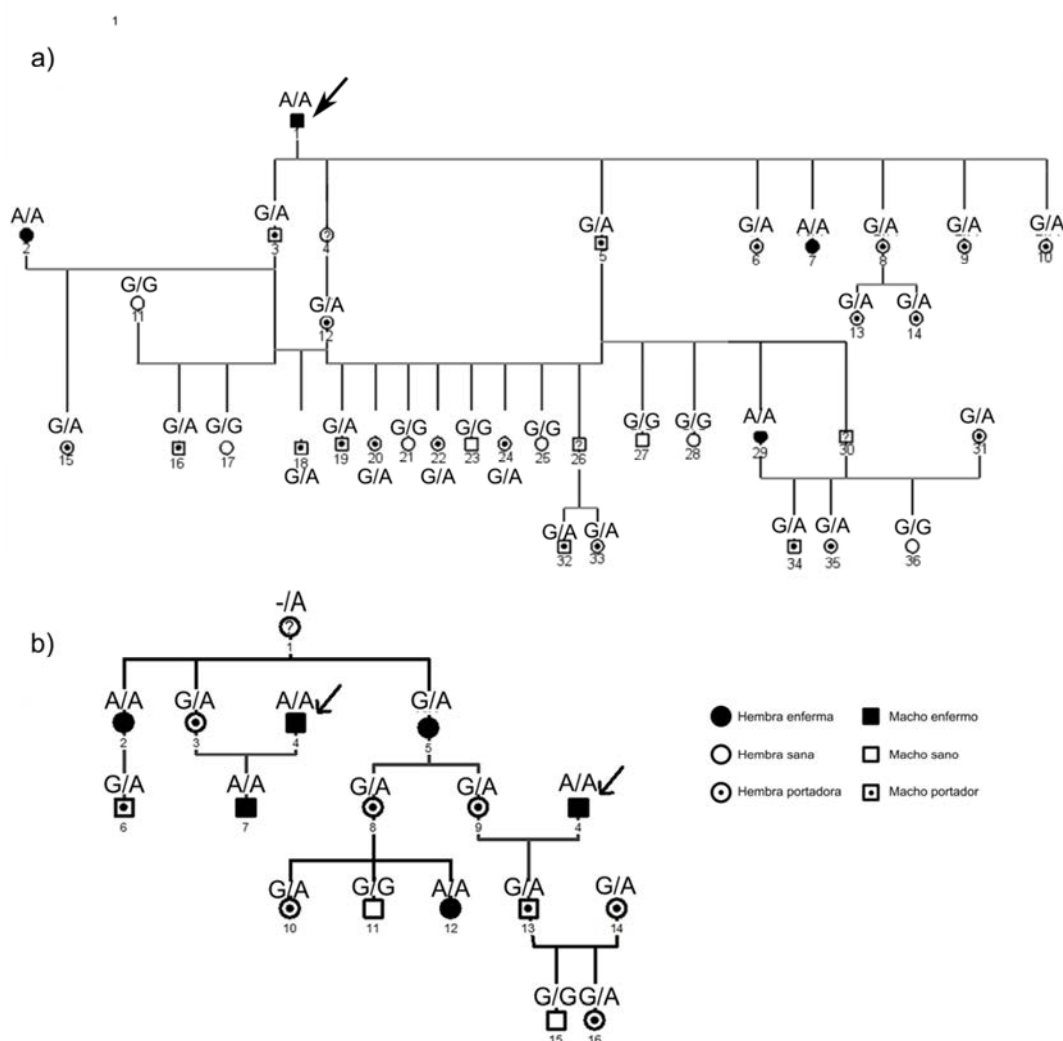


Figura 26. Pedigrís reconstruidos para los dos grupos que presentaban animales emparentados. Con una flecha se señala el ancestro común entre ambas familias. a) = familia 1; b) = familia 2.

Gen de la Resistencia a Multidrogas 1 - MDR1 (ABCB1)

Amplificación del fragmento

Para la mutación **nt230 [del4]** del gen **ABCB1 (ATP binding cassette subfamily B member 1 - Gen de Resistencia a Multidrogas)** causante de la enfermedad conocida como Sensibilidad a los medicamentos, se siguió la misma estrategia que en los casos anteriores. Se comenzó con el análisis de las secuencias reportadas en GenBank, NCBI Reference Sequence: NM_001003215.2 - Cromosoma 14 – Exón 4. Posteriormente, se diseñaron los cebadores (**Tabla 9**) para la amplificación de un fragmento que contenga la región de la delección. Los resultados obtenidos, evidenciaron un producto de amplificación esperado de 150 pb de tamaño (**Figura 27**).

Secuenciación

Se secuenciaron los productos de amplificación de un sub-set de muestras y los resultados obtenidos se compararon con la secuencias de referencia. Estos análisis permitieron confirmar la identidad de las secuencias amplificadas.

Además, mediante este análisis se pudo detectar la presencia de la mutación **nt230 [del4]** en las poblaciones locales de la raza Collie, Border Collie y Pastor Shetland.

En las secuencias obtenidas se pudo observar claramente los tres genotipos posibles, homocigota para el gen normal (ATAG/ATAG);

heterocigota (ATAG/ -); en estos últimos, como consecuencia que uno de los alelos presentala secuencia normal y el otro con la deleción, se evidencia un corrimiento de la secuencia de ADN a partir de la deleción en el alelo mutado, solapándose sobre el alelo normal. Además, se pudieron detectar animales con genotipo homocigota para la mutación, donde la deleción se encuentra en ambos alelos (**Figura 28 a-c**).

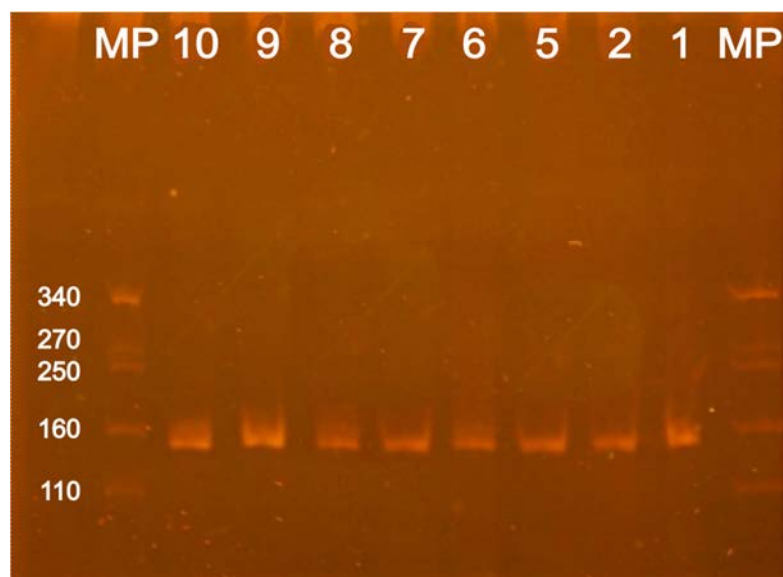


Figura 27. Gel de poliacrilamida 6% donde se observan los amplificados de fragmento de 150 pb del gen ABCB1. MP = marcador de peso molecular.

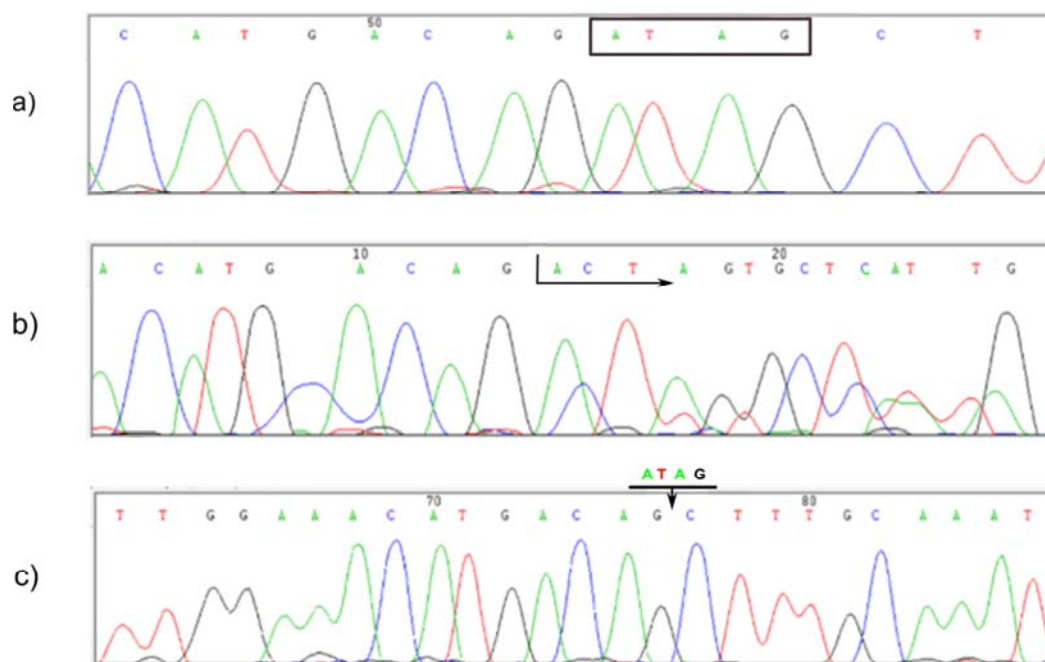


Figura 28. Electroferogramas obtenidos por secuenciación capilar del fragmento del gen ABCB1, donde se observa el sitio de la mutación nt230 [del4]. a) genotipo de un individuo con genotipo homocigota para el alelo normal (ATAG/ATAG); b) genotipo Heterocigota (ATAG/-); c) genotipo Homocigoto para el alelo mutado (-/-).

Genotipado por Pirosecuenciación

El paso siguiente, al igual que en las dos enfermedades anteriores consistió en el desarrollo y validación de un método basado en pirosecuenciación para la tipificación de la muestra total. Se pirosecuenciaron los animales de los que se conocía su genotipo, (por secuenciación capilar), y se obtuvieron los pirogramas correspondientes a cada uno de ellos (**Figura 29**).

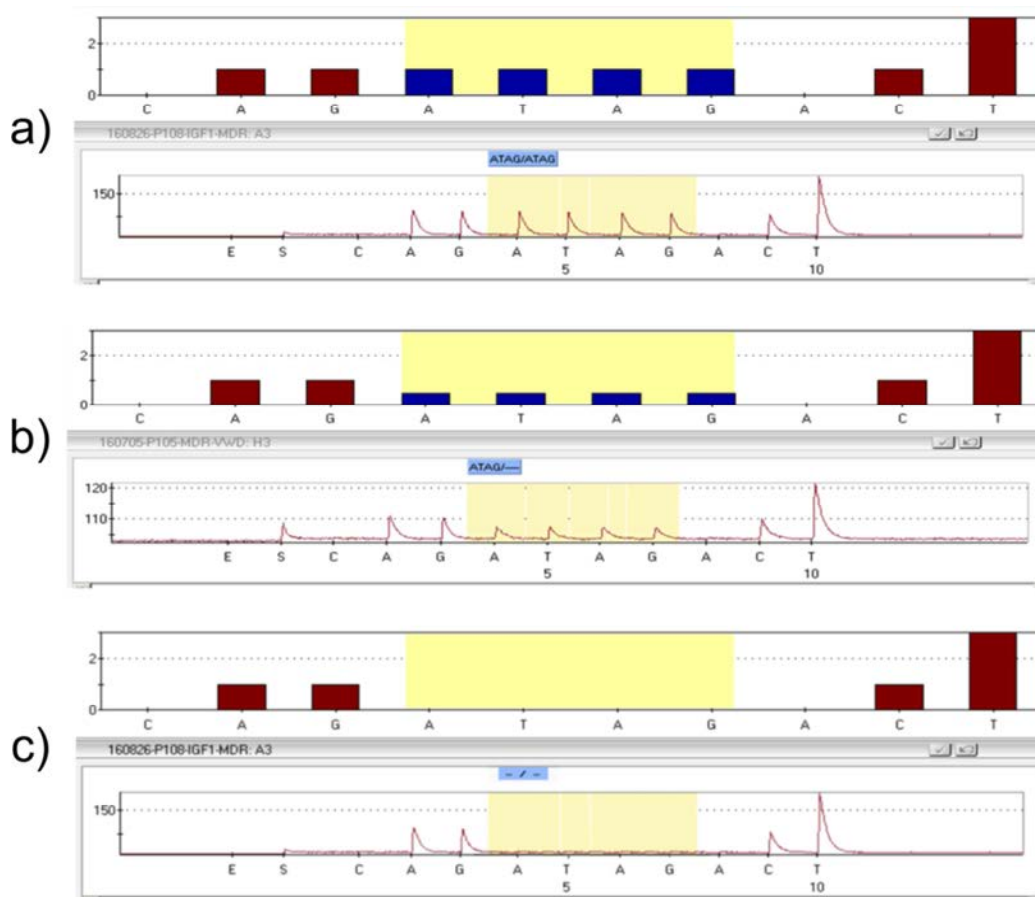


Figura 29. Genotipos obtenidos por pirosecuenciación. Homocigota para el alelo normal ATAG/ATAG (a); heterocigota ATAG/- (b); homocigota para la delección (-) (c).

Análisis estadístico

Los animales muestreados se genotiparon mediante los métodos de secuenciación directa y pirosecuenciación, obteniéndose un 100% de concordancia en los resultados obtenidos con ambos métodos (**Figuras 28 y 29**). Posteriormente, las frecuencias génicas y genotípicas para el alelo nt230 [del4] del gen ABCB1 canino se calcularon en el total de la muestra y en cada raza por separado (**Tabla 16**).

Junto con los perros de las razas susceptibles utilizados en este trabajo (Collie, Border Collie y Pastor de Shetland), se genotiparon por pirosecuenciación animales de otras razas (Airedale terrier, Bulldog francés, Caniche Toy, Dóberman, Dogo argentino, Fox terrier Wire, Golden retriever y Podenco faraónico, las cuales pertenecen a grupos de “perros no pastores”. (**Figura 30**)

También por la técnica de NGS se tipificaron 93 perros para esta mutación, pertenecientes al grupo de los denominados perros no pastores, de raza Caniche Toy y Doberman.

Entre los animales analizados tanto por pirosecuenciación (13) como por NGS (93) y que no correspondían a los grupos de las razas susceptibles, no se encontró el alelo mutado nt230 [del4] del gen ABCB1.

Tabla 16. Frecuencias alélicas del total de los animales genotipados para la mutación nt230 [del4] del gen ABCB1. p= alelo ATAG; q = alelo con la delección.

Grupo	n	p	q
Población total	72	0,85	0,15
Collie	30	0,68	0,32
Border Collie	17	0,94	0,06
Pastor de Shetland	12	1	0
Otras razas	13	1	0

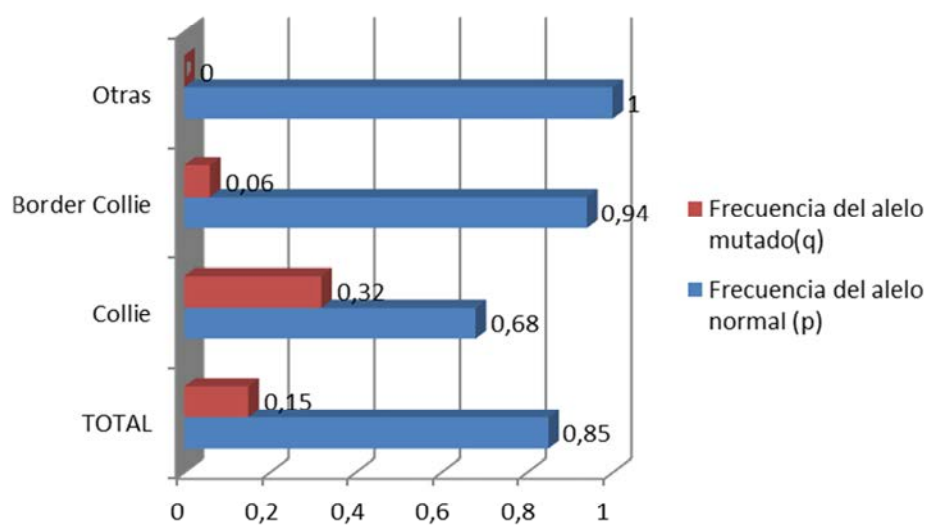


Figura 30. Gráfico con las frecuencias de los alelos p = normal y q = mutado para las razas Collie, Border Collie, el total de la población y en otras se incluyen al Pastor de Shetland y el grupo de perros de otras razas no pastores.

La muestra analizada presentó una H_e de 0,25 y una H_o de 0,15. La estimación del HWE en la población total y dentro de cada uno de los cuatro grupos raciales evidenció que solo en el total de la muestra se observó un desvío significativo con respecto a las proporciones teóricas esperadas para el equilibrio ($p=0,004$) (**Tabla 17**).

La prueba de diferenciación génica entre pares de grupos evidenció valores significativos entre la raza Collie y los otros tres grupos (Pastor de Shetland, Border Collies y el grupo de las razas no pastores).

La mayor diferencia se detectó con el grupo de otras razas ($p=0,00044$), seguida por la detectada con el grupo de la raza Pastor de Shetland ($p= 0,00091$) y por último con el grupo de la raza Border Collie ($p=0,00286$). Esta estructuración poblacional sería la causa del desequilibrio de HWE observado en la muestra total, hecho comúnmente observado en la especie canina (**Tabla 18**).

Tabla 17. Frecuencias genotípicas para del gen ABCB1. (+/+) Genotipo homocigota normal, (- / -) Genotipo homocigota mutado, (+/-) Genotipo heterocigota. HWE: equilibrio de Hardy-Weinberg, H_e: Heterocigosidad esperada, H_o: Heterocigosidad observada

Grupo	Frecuencias genotípicas %			HWE (valor de p)	H _e	H _o
	(+/+)	(- / -)	(+/-)			
Población total	56 (0,78)	5 (0,07)	11 (0,15)	0,004	0,25	0,15
Collie	16 (0,53)	5 (0,17)	9 (0,30)	0,099	0,43	0,30
Border Collie	15 (0,88)	0	2 (0,12)	1,000	0,11	0,12
Pastor de Shetland	12 (1)	0	0	-	-	-
Otras razas	13 (1)	0	0	-	-	-

Tabla 18. Valores de las diferencias génicas de la mutación nt230 (del4) del gen ABCB1 entre los grupos estudiados.

Par de Grupos	Valor de p	Chi 2
Collie - Border Collie	0,00286	11,71
Collie - Otras razas	0,00044	15,46
Border Collie - Otras razas	0,50021	1,38
Pastor de Shetland - Collie	0,00091	14
Pastor de Shetland - Border Collie	0,50585	1,36
Pastor de Shetland - Otras razas	-	-

DISCUSIÓN

En países donde la cría de perros de raza es una actividad importante, la selección como método para obtener animales de pura raza de buena calidad, tiene un papel preponderante. De esta forma se busca mejorar cualidades y aptitudes a lo largo del tiempo, cumpliendo estándares y características ideales para cada raza.

Este proceso de selección permite obtener ejemplares más aptos y fenotípicamente acordes a los estándares raciales, para luego utilizarse como reproductores de las siguientes generaciones. En el afán de buscar el "fenotipo ideal", se van seleccionando caracteres de manera conjunta y no siempre de ese conjunto forman parte caracteres deseados. Actualmente, la práctica más usada en los circuitos de cría de perros es la selección mediante la cruce de animales emparentados en las mismas líneas de sangre dentro de un criadero (*inbreeding*). Sin embargo, también existen otros mecanismos como los de consanguinidad media (*linebreeding*) y de cruce abierta (*outcross*). Independientemente del tipo de cruzamiento que se utilice, los clubes de las diferentes razas de perros no cuentan con programas de mejora donde se definan los criterios de selección y se estimen valores de cría para los diferentes caracteres de interés, como sí ocurre en otras especies de animales domésticos. Además, se estima que hasta dos tercios de los perros de raza que se anotan en las distintas federaciones vienen de criaderos irregulares, sin contar los animales pertenecientes a particulares.

Lo que usualmente se llama "selección genética" en el ámbito de los criadores, no es precisamente eso; se debería de contar con varias

generaciones de animales e ir seleccionando una o varias características de interés por cada línea de cría. Esto debería incluir no solo características relacionadas a los estándares raciales sino también caracteres funcionales (Ej., reproductivos). La selección que se realizan hoy en día es principalmente fenotípica, basada en el grado de consanguinidad y el control de la descendencia. Además, esto está muy influenciado por el éxito de los reproductores en las competiciones organizados por lo clubes.

Este tipo de prácticas trajo consigo que distintas mutaciones en el genoma de los perros aumenten significativamente su aparición; “la endogamia limita la diversidad genética y aumenta la posibilidad de transmitir una enfermedad de origen genético a la siguiente generación”. Las más importantes son las enfermedades de herencia autosómico recesivo, que actualmente representan un 75% del total de las enfermedades hereditarias. Este tipo de herencia predominante hace difícil la identificación de los animales portadores y la erradicación de los alelos causales y, por consiguiente, evitar la trasmisión de las mutaciones a las siguientes generaciones.

Existen también enfermedades hereditarias que tienen la particularidad de expresarse de forma tardía. Un cachorro al momento del nacimiento es en apariencia normal y recién a los 4 o 5 años de vida comienza a manifestar algún tipo de signo. Este perro adulto podría haber sido utilizado como reproductor en varias ocasiones. Casos similares se

pueden dar cuando la enfermedad genética tiene una herencia de tipo dominante pero con penetrancia incompleta.

Por eso, un aspecto que debiera ser muy importante en los criaderos es, que al momento de detectar una enfermedad que se sospecha que es de origen genético, se identifiquen a los animales portadores y así se modifiquen los programas de cría.

Los análisis bioquímicos generalmente no suelen discriminar que animales son portadores, por lo que son de gran importancia los test genéticos de diagnóstico, pudiendo de esta manera genotipar las mutaciones causales de los gen responsable de la enfermedad, e identificar aquellos animales con genotipos sanos, portadores y enfermos.

Actualmente, se han descrito más de 700 enfermedades en caninos, de las cuales en un tercio de ellas aún no se conoce el desorden molecular a nivel del ADN (omia.org/). Además, para muchas de las mutaciones causales reportadas no se conoce su prevalencia en las diferentes razas caninas. Es por esta razón que tanto los estudio de mapeo de mutaciones causales como los trabajos posteriores de epidemiología molecular son de gran importancia para la cría de perros.

Argentina es un país donde la cría y comercialización de perros es una actividad económica de gran importancia, tanto es así, que como se mencionó anteriormente, es la actividad con más mercados internacionales abiertos hoy día, por lo que la exportación de animales vivos o semen (<http://www.senasa.gob.ar/>).

En el contexto antes mencionado de producción, comercialización y exportación de perros en la Argentina, la problemática de las enfermedades hereditarias en el país no escapa a la situación de otros países. A diferencia de estos, aquí la información sobre las prevalencias de las enfermedades genéticas y las frecuencias de las mutaciones causales es inexistente, muy escasa o no se difunde. Tal vez motiva esto, la falta de test diagnósticos que posibiliten un rápido resultado y con un costo accesible para los criadores. Además, es necesario un intenso trabajo de difusión y concientización de la importancia de las enfermedades genéticas por parte de los profesionales.

Es por esta razón que el objetivo general de la presente Tesis Doctoral consistió en demostrar la hipótesis que las mutaciones para las enfermedades **Degeneración Progresiva de Conos y Bastones (PRCD)**, **Gen de Resistencia a Multidrogas 1 (MDR1/ ABCB1)** y **Von Willebrand Tipo I (EvW I)** están presentes en Argentina, afectando a diferentes razas; que es posible detectarlas molecularmente, y que las frecuencias génicas de cada uno de los alelos mutados en las poblaciones locales estudiadas son divergentes?? con respecto a las reportadas en otros países.

La elección de las tres enfermedades con las que se trabajó, se debió en principio a la demanda de los propios criadores de las razas involucradas, y posteriormente, al nivel de conocimiento que se pudo obtener sobre dichas enfermedades, especialmente sobre su origen a nivel molecular. Además, estudios previos apoyaban la hipótesis que esas

enfermedades genéticas tendrían una alta prevalencia en determinadas razas o grupo de razas y estarían ausentes o a baja frecuencia en el resto.

A diferencia de la utilización de los métodos tradicionales de diagnóstico, la detección de estas enfermedades o de sus respectivos alelos mutantes por test moleculares permitió obtener una primera aproximación de las frecuencias de estas en el país. La posibilidad de identificar los animales portadores de la mutación es una ventaja por sobre los diagnósticos tradicionales.

En particular, en la enfermedad de PRCD (Degeneración Progresiva de Conos y Bastones), a diferencia de otros tipos de atrofas de retina, los primeros signos aparecen en perros de edad media. En etapas juveniles, estos animales no presentan signos clínicos, aun realizando estudios electrorretinográficos. Seguramente, como se discutió anteriormente, estos perros que desarrollan tardíamente la enfermedad podrían haber sido empleados como reproductores, transmitiendo las variantes mutadas a la descendencia antes de ser diagnosticados. Igual situación ocurre con las enfermedades EvW (Enfermedad de von Willebrand) y MDR1 (Resistencia a Multidroga 1), por su modo de herencia (en la primera) y con la imposibilidad práctica de realizar un diagnóstico clínico sencillo (en la segunda).

La técnica de pirosecuenciación utilizada en este trabajo, no es una metodología nueva en comparación a otras técnicas utilizadas en otros

países, donde la elevada demanda de genotipificación de bajo costo ha dado lugar a las distintas tecnologías de secuenciación de alto rendimiento (Church 2006, Hall 2007) que son capaces de paralelizar muchas operaciones de secuenciación, produciendo miles o millones a la vez, reduciendo los costos gracias a ello. Son las llamadas secuenciaciones de nueva generación (NGS). Las ventajas que proporcionan los métodos de NGS, si bien son altamente favorables, en nuestro país la demanda de este tipo de análisis (enfermedades genéticas) aún no llegan a tener un volumen que justifique el uso de estas tecnologías, por lo que los costos por análisis se encarecerían significativamente.

La Pirosecuenciación nos permitió obtener un método de diagnóstico rápido, confiable, repetible y a un costo relativamente bajo, de acuerdo a las circunstancias y realidad en la que se encuentra el sector productivo relacionado a los perros en Argentina.

En las primeras etapas del trabajo, se pudo confirmar la presencia de las tres mutaciones asociadas a las enfermedades en las razas estudiadas. Secuenciando, en primera instancia los fragmentos de interés, constatando de esta manera la efectividad de los cebadores y el sitio de interés, y luego poniendo a punto por pirosecuenciación la genotipificación. Todos los cebadores utilizados en este trabajo fueron de diseño propio.

En cuanto a **la Degeneración Progresiva de Conos y Bastones** como se mencionó anteriormente, son muchas las afecciones que involucran la visión en los perros, por lo que enfermedades similares podrían tener orígenes genéticos diferentes. Además, la correlación entre el fenotipo y el genotipo podría estar también afectada por la manifestación tardía de la enfermedad (por ejemplo, los primeros signos clínicos comienzan a partir de los 3 -5 años) o por una penetrancia incompleta de los genotipos. Es por estas razones que en los resultados obtenidos sobre la mutación causal G1298A de la PRCD y sobre la prevalencia de la enfermedad, era de esperar que al momento de genotipificar los animales se encontraran diferentes situaciones: i. animales con signos de la enfermedad pero homocigotas normales o heterocigotas; ii. animales sanos con genotipo homocigota para el alelo mutado; iii. perros sin la enfermedad y homocigotas normales o heterocigotas; y iv. animales enfermos homocigotas para el alelo mutado.

De todos los animales que se analizaron, solamente 10 presentaron signos clínicos y electroretinografías positivas. Tres de ellos pertenecían a la raza Labrador. Sin embargo, ninguno de estos perros eran homocigotas para el alelo mutado. De los siete animales restantes, todos de la raza Caniche Toy, solamente 2 tenían el genotipo homocigota mutado G1298A para la enfermedad PRCD, 3 eran homocigotas para el alelo normal y 2 eran heterocigotas. Si se tiene en cuenta que la PRCD causada por la mutación G1298A tiene un tipo de herencia autosómica recesiva (Villagrasa, 1992), en los animales con signos clínicos pero que

no son homocigotas para el mutado la enfermedad estaría causada por otra mutación o por otra causa ambiental. Por otra parte, todos los animales homocigotas para la mutación G1298A presentaban algún tipo de signo clínico. Sin embargo, cabe aclarar que los datos surgidos de la presente Tesis no permiten evaluar el tipo de herencia Mendeliana propuesto en la bibliografía.

Respecto a las frecuencias génicas encontradas del alelo mutado (q), en el caso de la raza Labrador, en nuestro trabajo fue de 0,06, similar a la encontrado por Dostal y col. (2011) y significativamente menor ($p < 0,01$) a las reportadas en Alemania y Japón por Galián y col. (2012) y Masamine y col. (2017). 0,15 y 0,11 respectivamente. Aunque no se puede descartar que estos resultados puedan deberse al tamaño de las muestras utilizadas, las diferencias observadas podrían estar evidenciando divergencias entre las poblaciones de labradores de diferentes países. Esta estructuración poblacional podría ser consecuencia del grupo fundador y posterior deriva génica en poblaciones de reducido tamaño con altos niveles de consanguinidad.

En el caso de los resultados obtenidos en la raza Caniche Toy, la frecuencia del alelo mutado en la población analizada fue de 0,2. Los estudios previamente reportado evidencian una amplia variabilidad en las frecuencias génicas entre los países estudias, siendo la más semejante la reportada por Masamine y col. (2017) para una población de Caniche Toy de Japón. Por el contrario, el único trabajo previamente realizado en el

país (Bernardes y col., 2014) reportó una frecuencia significativamente mayor (**Tabla 19**).

También se evaluó la frecuencia de la mutación en cada raza, dependiendo del sexo de los animales, y en principio, en los Labradores no se observaron diferencias entre sexos y si se pudo ver una mayor frecuencia de la mutación en hembras de la raza Caniche Toy (3:1). Sin embargo, esto podría deberse a que los tres perros homocigotas para la mutación eran hembras. Esta observación tendría que ser confirmada aumentando el tamaño de la muestra.

Tabla 19. Frecuencias génicas del alelo mutado (q) en las razas Labrador y Caniche Toy en distintos países.

Raza	País	(n)	q	Referencia
Labrador	Rep. Checa	8	0,07	Dostal y col. 2011
	Alemania	1300	0,15	Galián y col. 2012
	Japón	114	0,11	Masamine y col. 2017
	Argentina	61	0,06	Presente trabajo
CanicheToy	Rep. Checa	59	0,45	Dostal y col. 2011
	Japón	200	0,09	Kohyama y col. 2016
	Argentina	15	0,6	Bernárdez y col. 2014
		67	0,2	Presente trabajo

Las primeras estimaciones que se obtuvieron sobre la prevalencia de la **Enfermedad de von Willebrand** en las poblaciones de perros de la raza Doberman fueron estimadas sobre la base de animales que presentaron signos. Así por ejemplo, las prevalencias reportadas fueron

del 63% en Estados Unidos (Dodds y col. 1981), del 36% en Italia (Gavazza y col. 2002), y del 30% en Brasil (Mattoso y col. 2010). Sin embargo, desde el año 2000, cuando se publicó la secuencia completa del gen vWF y se pudo conocer la mutación c.7437G>A causal de esta enfermedad, comenzaron a publicarse las estimaciones de prevalencia del alelo mutado en diferentes países (Venta y col. 2000). Los resultados obtenidos en el total de la población de Doberman Pinscher analizada en este trabajo mostraron una frecuencia para el alelo mutado c.7437G>A de 0,41. Estos resultados coincidieron con los reportados en otros países, siendo incluso levemente menor a lo publicado para la población de Doberman Pinscher de Estados Unidos (Venta y col. 2004) que fue de 0,46.

Es interesante resaltar como la frecuencia génica media estimada para la población de Doberman Pinscher de Argentina variaba significativamente cuando se consideraban establecimientos en particular. En los grupos de perros que tenían relaciones de parentesco entre sus integrantes y que pertenecían a un criadero determinado, las frecuencias génicas fueron de 0,43 y 0,58 (familia 1 y 2, respectivamente). Las frecuencias obtenidas para los distintos grupos analizados muestran una similitud entre ellas, y con los reportes de otros países. Mientras que cuando solo se consideraban perros que no tenían relación de parentesco entre ellos se encontró una frecuencia del alelo mutado más baja, de 0,36.

Estos resultados reflejan claramente el efecto de la incorporación de un animal homocigota o portador para la mutación c.7437G>A en un criadero, así como, la importancia de genotipar a los reproductores para las principales enfermedades genéticas presentes en cada raza. En este sentido, los dos grupos familiares comparten un ancestro común que era homocigota para la mutación c.7437G>A. La introducción de este reproductor seguido de sucesivos cruzamientos entre animales emparentados tuvo como consecuencia un aumento significativo de la enfermedad con respecto a la población de animales no relacionados.

Además, estos resultados son consistentes con lo planteado sobre los métodos de cría en las razas de perros, y en particular con la raza Doberman, la mayoría de los animales que forman parte de la población total de esta raza comparten ancestros comunes (grupo fundador), lo que sumado a los sistemas de endocría y exocría con la utilización de perros “destacados”, aumenta el riesgo de incrementar el número de animales con el alelo mutado, ya sea en estado homocigota o heterocigota. Esto último podría explicar que las frecuencias alélicas dentro de las consideradas familias no sea aún mayor del valor encontrado dentro de los animales aparentemente no relacionados.

Diferentes autores han propuesto para la enfermedad de EvW dos modos de herencia, autosómica recesiva o dominancia con penetrancia incompleta (Stokol y col. 1993, Brooks y col. 2001, Riehl y col. 2001, Lubas y col. 2010). El resultado obtenido en el presente trabajo apoyaría la hipótesis de un modo de herencia de tipo **Dominante con Penetrancia**

Incompleta y es consistente con la mayoría de los últimos reportes bibliográficos. La alta frecuencia con la que aparece el alelo mutado del gen vWF en relación a la aparición de la enfermedad EvW apoya el modo de herencia propuesto. Además, el análisis de los signos clínicos junto con los genotipos de los animales apoyó lo expuesto anteriormente. Ninguno de los animales homocigotas para el alelo normal presentó signos consistentes con la enfermedad, y solo los animales con al menos un alelo mutado presentaron signos. Por lo que la presencia de una copia sería suficiente para el desarrollo de la enfermedad, evidenciando su efecto dominante. Sin embargo, la presencia de animales portadores que no evidenciaron signos clínicos estaría evidenciando un penetrancia incompleta. Estudios adicionales son necesarios para identificar que otros factores genéticos y/o ambientales son importantes para la manifestación de la enfermedad. Teniendo en cuenta los resultados de laboratorio de los animales analizados, ninguno mostró valores que indiquen la presencia de alguna coagulopatía ni relación con el genotipo.

Reportes previos a este trabajo muestran que la prevalencia de la enfermedad ésta influenciada por diferentes factores, tales como sexo y color. Mattoso y col. (2010) reportaron una mayor prevalencia en hembras que en machos. Sin embargo, Stokol y col. (1995) encontraron una frecuencia mayor en machos. En contraste con estos resultados en el presente trabajo no se encontraron diferencias en la frecuencia alélica entre ambos sexos, por lo que las diferencias previamente publicadas serían consecuencias de errores de muestreo.

En relación al color de capa, estudios previos reportaron una asociación entre los llamados Doberman Azul y la EvW (Riehl y col. 2000). Sin embargo, esta hipótesis no pudo ser contrastada ya que en este estudio solo se utilizaron perros color marrón y fuego y negro y fuego. De todas maneras tampoco se encontraron diferencias significativas entre los grupos de animales correspondientes a estos tres colores de capa.

Los animales que se analizaron para la EvW I mediante NGS, también fueron genotipificados para los otros tipos de la enfermedad, EvW II, EvW III y EvW III_2. Todos ellos de raza Doberman, y en ninguno se encontró el alelo mutado causante de las otras tres variantes clínicas. Este dato confirma lo publicado anteriormente por la bibliografía donde se reporta para esta raza la EvW tipo I.

La determinación de las prevalencias del **Gen de Resistencia a Multidroga 1**, tanto de la enfermedad como de la mutación causal de la enfermedad, comenzó a tomar relevancia en los últimos años luego del descubrimiento del gen portador de la mutación (Mealey 2001). Aun así, el uso de Ivermectina en perros de las razas susceptibles está restringido muchas veces por los propios veterinarios, teniendo en cuenta el alto grado de toxicidad que puede llegar a tener en animales homocigotas para la mutación. Por el contrario, la alternativa de realizar análisis genéticos para determinar el genotipo de los animales de razas susceptibles aún no se ha generalizado, por lo que los profesionales optan por el uso de otros antiparasitarios.

La prevalencia de la enfermedad encontrada en este trabajo fue de 17% en la raza Collie, con una frecuencia del alelo mutado de 0,32. Estas estimaciones se encuentran por debajo de los registros de otros países, donde las prevalencias de la enfermedad se encuentran entre el 25 y el 50% (**Tabla 20**).

Esta discrepancia puede estar dada principalmente al tamaño de la muestra poblacional utilizada. Hoy en día la raza Collie no se encuentra dentro de la más popular y a este hecho se le suma, en muchos casos, el desinterés de los propios criadores y de las asociaciones por conocer el estado de sus perros.

Tabla 20. Cuadro comparativo de la frecuencia génicas y genotípicas de la mutación (q) nt230 [del4] del gen ABCB1 canino reportadas en otros países y las encontradas en este estudio para la raza Collie. (+): Alelo normal (-): Alelo mutado, (n) número de animales, (+/+) Genotipo homocigota normal, (+/-) Genotipo heterocigota, (-/-) Genotipo homocigota mutado.

País/Región	n	q	(+/+)	(+/-)	(-/-)	Referencia
Alemania	578	0,55	0,24	0,43	0,33	Geyer et. al, 2005
EE.UU	161	0,51	0,26	0,46	0,28	Neff et. al, 2004
Reino Unido	94	0,60	0,15	0,51	0,34	
Australia	33	0,56	0,12	0,64	0,24	Mealey et. al, 2005
Francia	25	0,64	0,20	0,32	0,48	Hugnet et. al, 2004
Japón	12	0,58	0,25	0,33	0,42	Kawabata et. al, 2005
Europa	1310	0,48	0,28	0,47	0,25	Firdova et. al, 2016
Brasil	104	0,61	0,14	0,5	0,36	Monobe y col. 2015
Argentina	30	0,32	0,53	0,30	0,17	Crespi y col., 2017

En las **figuras 31 y 32** se comparan las frecuencias genotípicas encontradas en perros de raza Collie en algunos países y las estimadas en nuestro país (a), así como las frecuencias génicas alelo mutado, utilizando los datos reportados por Geyer y col. (2005).

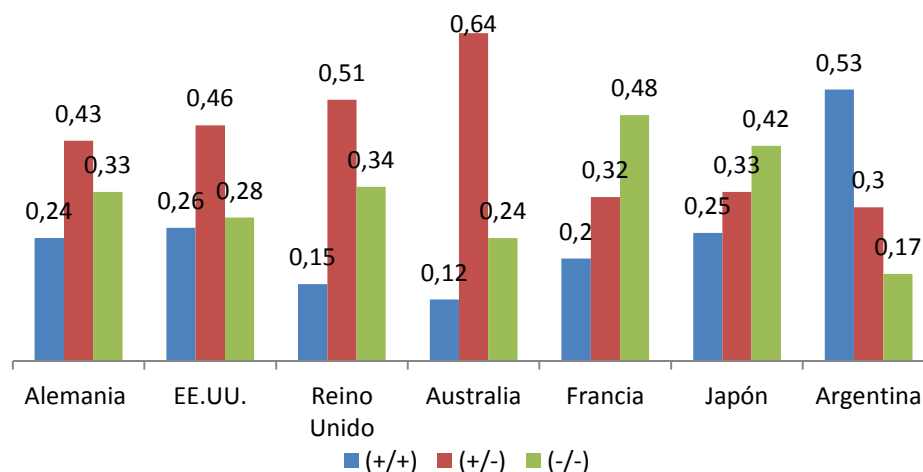


Figura 31. Frecuencias genotípicas observadas en distintos países en perros de raza Collie. (+/+) Genotipo homocigota para el alelo sano, (+/-) Genotipo heterocigota, (-/-) Genotipo homocigota para el alelo con la delección.

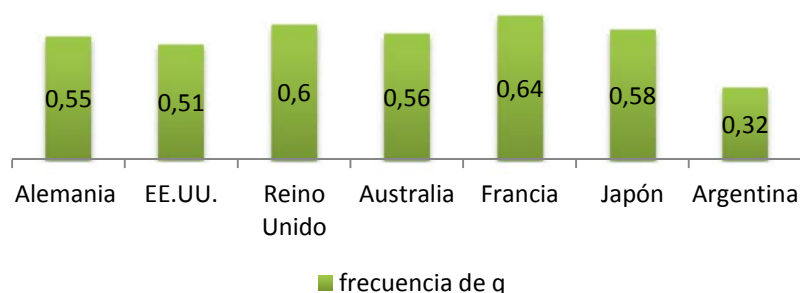


Figura 32. Frecuencias alélicas para el alelo mutado con la delección en distintos países.

En el caso de la raza Border Collie, no se encontraron perros homocigotas para la mutación, siendo todos los perros heterocigotas u homocigotas para el alelo normal. La prevalencia del alelo nt230 [del4] en la muestra local fue de 0,06, seis veces mayor que la reportada por Gramer (2011) ($q = 0,01$) y diez veces mayor que la reportada por Greyer y col. (2005) ($q = 0,006$). Huebner y col. (2007) en su trabajo en perros en Alemania no encontró el alelo mutado ($q = 0$), igual resultado obtuvo Fridova y col. (2016) al estudiar las frecuencias del alelo en distintos países de Europa (**Tabla 21**).

Se puede destacar que en los países en donde existe algún registro de la frecuencia del alelo nt 230 [del4], esta es baja respecto de la encontrada por ejemplo en los perros de raza Collie.

En cuanto a la población local de la raza Pastor de Shetland, aunque en otros países la frecuencia del alelo mutado ronda el 0,3 (Huebner, 2007; Gramer et al., 2011), Fridova y col. también reportó una frecuencia del alelo nt230 [del4] del 0,3 en perros de varios países europeos. Frecuencias menores fueron estimadas por Stiedl y col. (2017; $q = 0,22$) y Monobe y col. (2015; $q = 0,08$) (**Tabla 22**). Por el contrario, en nuestro estudio no encontramos el alelo nt230 [del4] en la muestra analizada de esta raza. Este resultados podría deberse al reducido número de animales de esta raza que se importaron a la Argentina, al bajo número poblacional y/o al tamaño de la muestra analizada.

Finalmente cabe mencionar que dado que los signos clínicos de esta enfermedad solo aparecen al administrarse la Ivermectina, no se pudo analizar ni el modo de herencia ni de asociación entre los genotipos y los fenotipos.

Tabla 21. Frecuencias génicas del alelo mutado nt230 [del4] (q) en la raza Border Collie en distintos países.

País	n	q	Referencia
	334	0,006	Greyer y col. 2005
Alemania	63	0	Huebner y col. 2007
	6	0	Stiedl y col. 2017
Alemania	527	0,01	Gramer y col. 2011
Brasil	77	0	Monobe y col. 2015
Europa	116	0	Fridova y col. 2016
Japón	500	0,002	Mizukami y col. 2016
Argentina	17	0,06	el presente trabajo

Tabla 22. Frecuencias génicas del alelo mutado nt230 [del4] (q) en la raza Pastor de Sheetland en distintos países.

País	n	q	Referencia
Brasil	76	0,08	Monobe y col. 2015
Europa	1400	0,3	Fridova y col. 2016
Alemania	22	0,22	Stiedl y col. 2017
Argentina	12	0	el presente trabajo

CONCLUSIONES

El presente trabajo de Tesis Doctoral se centró en la estimación de la prevalencia de tres enfermedades de origen genético, Degeneración Progresiva de Conos y Bastones (PRCD), Von Willebrand Tipo I (EvW I) y Gen de Resistencia a Multidrogas 1 (MDR1 / ABCB1) y de los alelos causales en varias razas de perros. Para cumplir con este objetivo, se desarrollaron métodos de detección basados en el análisis del ADN. Las principales conclusiones obtenidas se detallan a continuación:

- La detección molecular de los alelos mutados mediante PCR-secuenciación directa y pirosecuenciación permitió confirmar la presencia en Argentina de alelos causales de las enfermedades Degeneración Progresiva de Conos y Bastones (PRCD), Von Willebrand Tipo I (EvW I) y Gen de Resistencia a Multidrogas 1 (MDR1).
- Se desarrolló un método de diagnóstico rápido, confiable y de costos accesibles para el mercado local.
- Se pudo establecer la prevalencia de la mutación causal G1298A de la enfermedad PRCD en las poblaciones locales de las razas Labrador y Caniches Toy.
- Se determinó una prevalencia del alelo mutado G1298A de 0,06 para los Labradores y de 0,19 para los Caniche Toy.
- Solo una reducida fracción de los animales homocigotas para la mutación presentaban signos de la enfermedad, con una prevalencia de 0 y 0,04 en las razas Labrador y Caniche Toy, respectivamente. La

expresión tardía de esta afección podría estar condicionando estos valores.

- En la raza Labrador no se encontraron diferencias significativas en las frecuencias estimadas para machos y hembras. Sin embargo, la diferencia observada en Caniches podría deberse al reducido tamaño de la muestra analizada.
- La prevalencia de la mutación G1298A estimada en la Argentina en el presente trabajo se encuentra dentro del rango de variación que ha sido reportado en diferentes países,
- Por primera vez se pudo establecer la prevalencia de la enfermedad **EvW I** y del alelo c.7437G > A en la población Argentina de la raza Doberman.
- Para la población general de Doberman estudiada la frecuencia de la mutación fue de 0,4. Sin embargo, se observó una distribución heterogénea de las frecuencias génicas, siendo mayor en los criaderos con ancestros que eran portadores de la mutación y con altos niveles de cruzamiento entre animales emparentados. Estos resultados pusieron en evidencia la importancia de la genotipificación de los reproductores.
- La prevalencia de la mutación c.7437G > A estimada en la Argentina en el presente trabajo se encuentra dentro del rango de variación que ha sido reportado en diferentes países,
- La prevalencia de la enfermedad (0,15), fue muy similar tanto para la población en general como para los grupos que eran parte de alguna familia o tenían alguna relación de parentesco.

- No se observaron diferencias significativas en las frecuencias génicas del alelo mutado teniendo en cuenta el sexo y el color de capa.
- Los resultados obtenidos apoyan la hipótesis de un modo de herencia dominante con penetrancia incompleta para la enfermedad EvW I en la raza Doberman.
- Se estableció por primera vez en el país la prevalencia de la enfermedad **MDR1 / ABCB1** y de la mutación nt230 del [del4] en las poblaciones locales de Collies, Border Collie y Pastor de Shetland. La frecuencia génica encontrada del alelo mutado varió entre las razas de pastores analizadas, siendo 0,32 en la raza Collie, 0,06 la raza Border Collie y 0 en los Pastor de Shetland. La prevalencia de la mutación nt230 del [del4] estimada en la Argentina en el presente trabajo para las razas Collies y Border Collie se encuentra dentro del rango de variación que ha sido reportado en diferentes países.
- La ausencia de esta mutación en la muestra analizada de la raza Pastor de Shetland contrasta con la alta prevalencia reportada en otros países. Este resultado podría ser consecuencia del efecto de muestreo (deriva génica) durante la formación del grupo fundador local. Sin embargo, esto deberá ser confirmado mediante un aumento del número de animales genotipados.
- Teniendo en cuenta el modo de herencia de la MDR1 / ABCB1, la prevalencia de los animales susceptibles a las Ivermectina (homocigotas para nt230 del [del4]) fue de 0,17 en la raza Collie.

- Como conclusión final, se puede tener en consideración la idea de realizar un relevamiento de las enfermedades con mayor presencia e importancia en poblaciones caninas argentinas y en razas a determinar; desarrollar un método de diagnóstico genético para éstas y evidenciar su prevalencia en el país.

Sin duda tener la posibilidad de conocer el genotipo para muchas de las enfermedades presentes en perros, que forman parte del circuito de reproducción y cría en el país, sería un gran aporte al objetivo de ir reduciendo las prevalencias de éstas.

BIBLIOGRAFIA

1. Ambudkar S, Dey S, Hrycyna C, Ramanchadra M, Pastan I, Gottesman M. Biochemical, cellular and pharmacological aspects of the multidrug transporter. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 1999; 39:361- 98.
2. Asher L, Diesel G, Summers JF, McGreevy PD, Collins LM. Inherited defects in pedigree dogs. Part 1: disorders related to breed standards. *Vet J.* 2009; 182(3):402–11.
3. Ayala FJ. *Population and Evolutionary Genetics.* The Benjamin/Cummings Publishing, Menlo Park, California, USA, 1982, p. 268.
4. Baars C, Leeb T, Klopmann T, Tipold A, Potschka H. Allele-specific polymerase chain reaction diagnostic test for the functional MDR1 polymorphism in dog. *Vet J.* 2008; 177(3):394-7.
5. Björnerfeldt S, Hailer F, Nord M, Vilà C. Assortative mating and fragmentation within dog breeds. *BMC Evol Biol.* 2008; 8:28.
6. Boudreaux MK. Inherited platelet disorders. *J Vet Emerg Crit Care.* 2012; 22(1): 30-41.
7. Brinkmeyer-Langford C, Komegay JN. Comparative Genomics of X-linked Muscular Dystrophies: The Golden Retriever Model. *Curr Genomics.* 2013; 144:330-42.
8. Brooks M, Dodds WJ, Raymond SL. Epidemiologic features of von Willebrand's disease in Doberman pinschers, Scottish terriers, and Shetland sheepdogs: 260 cases (1984–1988). *J Am Vet Med Assoc* 1992; 200:1123–7.

9. Brooks M, Raymond S, Catalfamo J: Plasma von Willebrand factor antigen concentration as a predictor of von Willebrand's disease status in German Wirehaired Pointers. *J Am Vet Med Assoc.* 1996; 209: 930-3.
10. Brooks M. A review of canine inherited bleeding disorders: biochemical and molecular strategies for disease characterization and carrier detection. *J Hered.* 1999; 90:112- 8,.
11. Brooks MB, Erb HN, Foureman PA, Ray K. von Willebrand disease phenotype and von Willebrand factor marker genotype in Doberman pinschers. *Am J Vet Res.* 2000; 62: 364–9.
12. Burgess HJ, Woods JP, Abrams-Ogg ACG, Wood D. Evaluation of laboratory methods to improve characterization of dogs with von Willebrand disease. *Can Jour Vet Res.* 2009; 73: 252-9.
13. Calboli FC, Sampson J, Fretwell N, Balding DJ. Population structure and inbreeding from pedigree analysis of purebred dogs. *Genetics.* 2008; 179(1):593–601.
14. Church G.M. Genomes for ALL. *Sci Am.* 2006; 294 (1): 47-54..
15. Coelho J, Tucker R, Mattoon J, Roberts G, Waiting D, Mealey K. Biliary excretion of technetium-99m sestamibi in wild-type dogs and in dogs with intrinsic (ABCB1 -1Δ mutation) and extrinsic (ketoconazole treated) P-glycoprotein deficiency. *J. Vet. Pharmacol. Therap.* 2009; 32: 417-21.

16. Conte A; Marrube G; Pinto G; Robledo G; Rozen F. Bases para el diagnóstico de las enfermedades hereditarias en los animales domésticos. Universidad de Buenos Aires, Facultad de Ciencias Veterinarias, Área Genética. 2004. [Online] http://www.fvet.uba.ar/areas/arch_genetica/diagnosthereditarias.pdf.
Accesado el 08 de febrero de 2018.
17. Correa AR, Castaño E. Evaluación de la mutación ABCB1-1Δ en perros y sus implicaciones terapéuticas y toxicológicas. Revista Biosalud. 2014; 13 (1): 65-75.
18. De León Vera M; Morales Fariña I. La electroretinografía como método de diagnóstico en las especies caninas y felinas. Revisión bibliográfica. Rev. Canaria de las Ciencias Veterinarias. Biblioteca Univesitaria, Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. 2011; 2: 58-65.
19. Dean M. The genetics of ATP-binding cassette transporters. Review. Methods Enzymol. 2005; 400: 409-29.
20. Denis CV, Wagner DD. Insights from von Willebrand disease animal models. Cell Mol Life Sci. 1999; 56:77–990.
21. Denis CV. von Willebrand factor in vascular pathophysiology. Pathol Biol. 2003; 51: 395–6.
22. Díaz, S; Ripoli, MV; Peral García, P; Giovambattista, G. Marcadores genéticos para resistencia y susceptibilidad a enfermedades infecciosas en animales domésticos. Los loci del complejo principal de

- histocompatibilidad (mhc) como genes candidatos. *Analecta Veterinaria*. 2005; 25 (1): 40-52
23. Dodds WJ, Moynihan AC, Fisher TM, Trauner DB. The frequencies of inherited blood and eye diseases as determined by genetic screening programs. *J Am Anim Hosp Assoc*. 1981; 17: 697–704.
24. Dodds WJ. Canine von Willebrand's disease. *J Lab Clin Med*. 1970; 76:13–21.
25. Dostal J, Hrdlicova A, Horak P. Progressive rod-cone degeneration (PRCD) in selected dog breeds and variability in its phenotypic expression - *Veterinári Medicína*. 2011, 56 (5): 243–7.
26. Duboscq C, Martinuzzo M. Actividad de Factor von Willebrand. *Hematologia*. 2012. 16 (1): 47-8
27. Duggan MJ, DiMichele DM, Christian MJ, Fink LM, Hathaway WE. Collagen-binding of von Willebrand's factor antigen in the classification of von Willebrand's disease. *Am J Clin Pathol*. 1987; 88: 97–102.
28. Erkens T, Daminet S, Rogiers C, Gommeren K, Lampo E, Vander Donckt D, et al. Presence of the ABCB1 (MDR1) deletion mutation causing ivermectin hypersensitivity in certain dog breeds in Belgium. *Vlaams Diergeneeskundig Tijdschrift*. 2009; 78: 256-60.
29. Esteban J, Regueiro MA, Tovar MC - Alteraciones más frecuentes del fondo ocular. *Argos Portal Veterinario*, 2013. [online] <https://argos.portalveterinaria.com/noticia/8920/articulos.html>
30. Fardel, O, Lecreur V, Guillouzo A. The P-Glucoprotein multigrus transporter. *Gen Pharmacol*. 1996; 27: 1283 - 91.

31. Favaloro EJ, Facey D, Henniker A. Use of a novel platelet function analyzer (PFA-100) with a high sensitivity to disturbances in von Willebrand factor to screen for von Willebrand's disease and other disorders. *Am J Hematol.* 1999; 62: 165–74.
32. Fecht S, Wohlke A, Hamann H, Distl O. Analysis of the canine MDR1 - 1Δ mutation in the dog breed Elo. *J. Vet. Med A.* 2007; 54: 401- 5.
33. Federici AB, Castaman G, Mannucci PM. Guidelines for the diagnosis and management of von Willebrand disease in Italy. *Haemophilia.* 2002; 8:607–21.
34. Fels L, Marschall Y, Philipp U, Distl O. Multiple loci associated with canine hip dysplasia (CHD) in German shepherd dogs. *Mamm Genome.* 2014; 25:262-9.
35. Firdova Z, Turnova E, Bielikova M, Turna J, Dudas A. The prevalence of ABCB1: c.227_230delATAG mutation in affected dog breeds from European countries. *Res Vet Sci.* 2016; 106:89-92.
36. Fontdevila A, Moya A. *Introducción a la Genética de Poblaciones.* Editorial Síntesis S.A. Madrid, España. 1999; p 349.
37. Ford, E.B. *Genetic Polymorphism.* All Souls Studies. Ed. Faber and Faber Limited, Londres, Inglaterra, 1965.
38. Fromm MF. Importance of P-glycoprotein for drug disposition in humans. Review. *Eur J Clin Invest.* 2003; 33 Suppl 2:6-9.

39. Galian M; Iff C; Kühnlein P; Müller E. Prevalencia de la mutación que causa pra-prcd en diversas razas de perros. Laboklin. Southern European Veterinary Conference 46 congreso Nacional AVEPA. 2007.
40. Gavazza A, Lubas G, Caldin M, Furnalello T, Tambone C. La Malattia di Von Willebrand I. Casistica personale nel cane allevato in Italia. *Veterinaria*, 2002; 16:1-13.
41. Gentilini F, Turba ME, Calzolari C, Cinotti S, Forni M, Zannoni A. Realtime quantitative PCR using hairpin-shaped clone-specific primers for minimal residual disease assessment in an animal model of human non-Hodgkin.lymphoma. *Mol Cell Probes*. 2010; 24(1): 6-14.
42. Gentili F, Turba ME. Two novel real-time PCR methods for genotyping the von Willebrand disease type 1 mutation in Doberman Pinscher dogs. *The Vet J*. 2013; 197: 457-60.
43. Geyer J, Döring B, Godoy JR, Moritz A, Petzinger E. Development of a PCR-based diagnostic test detecting a nt230 (del4) MDR1 mutation in dogs: verification in a moxidectin-sensitive Australian Shepherd. *J Vet Pharmacol Ther*. 2005; 28 (1): 95-9.
44. Geyer J, Klintzsch S, Meerkamp M, Wohlke A, Distl O, Moritz A. et al. Detection of the nt230(del4)MDR1 mutation in White Swiss Shepherd dogs: Case reports of doramectin toxicosis, breed predispositions, and microsatellite analysis. *J. Vet. Pharmacol. Therap*. 2007; 30: 482-5.
45. GfKgroup.[online]
<https://www.gfk.com/fileadmin/userupload/countryonepager/AR/documents/Global-GfK-surveyPet-Ownership2016.pdf>. 2016

46. Gokbulut C, Karademir U, Boyacioglu M, McKellar Q. Comparative plasma dispositions of ivermectin and doramectin following subcutaneous and oral administration in dogs. *Vet. Parasitol.* 2006; 135: 347-54
47. Gramer I, Leidolf R, Doring B, Klintzsch S, Kramer E, Yalcin E. et al. Breed distribution of the nt230(del4) MDR1 mutation in dogs. *The Vet J.* 2011; 189: 67-71.
48. WeiKuan G; Ray K; Pearce-Kelling S; Baldwin VJ; Langston AA; Ray J; Ostrander EA; Acland GM; Aguirre GD. Evaluation of the APOH Gene as a Positional Candidate for prcd in dogs. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1999; 40 (6):1229-37.
49. Harder A, Holden-Dye L, Walker R, Wunderlich F. Mechanisms of action of emodepside. *Parasitol Res* 2005; 97: suppl 1:S1- S10.
50. Hazbón MH, Alland D. Hairpin primers for simplified single-nucleotide polymorphism analysis of *Mycobacterium tuberculosis* and other organisms. *J Clin Microbiol.* 2004; 42(3): 1236-42.
51. Hedrick PW. *Genetics of populations*, 3rd ed., Jones and Barlett Publishers, Inc. Boston, USA; 2005; p.342
52. Hedrick, P.W. *Genetic of Populations*. Jones and Bartlett Publishers, Inc. Boston, USA; 1983; p629.
53. Heng Li et al. The Sequence Alignment/Map format and SAMtools. (2009) *Bioinformatics* 25(16), 2078-9. [online] <http://dx.doi.org/10.1093/bioinformatics/btp352>

54. Hoelzel AR. Molecular Genetic Analysis of Populations: A Practical Approach. Second Edition. IRL Press at Oxford University Press. New York, USA. 1998; p445.
55. Holmes NG, Shaw SC, Dickens HF, Coombes LM, Ryder EJ, Littlewood JD, Binns MM. von Willebrand's disease in UK dobermanns: Possible correlation of a polymorphic DNA marker with disease status. *J Small Anim Pract.* 1996; 37(7):307-8.
56. Hooper K, Aldrich J, Haskins S. Ivermectin toxicity in 17 Collies. *J Vet Intern Med.* 2002; 16: 89-94.
57. Huebner J, Kühnlein P, Langbein-Detsch I, Müller E. Canine mdr-1-mutation- breed disposition and prevalence in dogs in Germany. LABOKLIN, Bad Kissingen, Germany; 2007
58. Hugnet C, Bentjen S, Mealey K. Frequency of the mutant MDR1 allele associated with multidrug sensitivity in a sample of collies from France. *J. Vet. Pharmacol Therap.* 2004; 27: 227-9.
59. Itoh Y, Maehara S, Yamasaki A, Tsusuki K, Izumisawa Y. Investigation of unilateral retinal detachment in Shit-tzu. *Veterinary Ophthalmology.* 2010; 13 (5): 289 – 93.
60. Juliano RL, Ling V. A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants. *Biochim Biophys Acta.* 1976; 455(1):152-62.
61. Kawabata A, Momoi Y, Inoue-Murayama M, Iwasaki T. Canine mdr1 Gene Mutation in Japan. *J. Vet. Med. Sci.* 2005; 67(11):1103-7.

62. Klintzsch S, Meerkamp K, Doring B, Geyer J. Detection of the nt230(del4) MDR1 mutation in dogs by a fluorogenic 5'nuclease TaqMan allelic discrimination method. *Vet J.* 2010; 185 (3): 272-7.
63. Kohyama M, Tada N, Mitsui H, Tomioka H, Tsutsui T, Yabuki A, et al.- Real-time PCR genotyping assay for canine progressive rod-cone degeneration and mutant allele frequency in Toy Poodles, Chihuahuas and Miniature Dachshuns in Japan. *J Vet Med Sci.* 2016 ; 78(3):481-4
64. Kramer JW, Venta PJ, Klein SR, Cao Y, Schall WD, Yuzbasiyan-Gurkan V. A von Willebrand's Factor Genomic Nucleotide Variant and Polymerase Chain Reaction Diagnostic Test Associated with Inheritable Type-2 von Willebrand's Disease in a Line of German Shorthaired Pointer Dogs. *Vet Pathol.* 2004; 41: 221
65. Kusahara H, Suzuki H, Sugiyama Y. The role of P-glycoprotein and canalicular multispecific organic anion transporter in the hepatobiliary excretion drugs. Review. *J Pharm Sci.* 1998; 87(9): 1025-40.
66. Labruyere J, Hartley C, Holloway A. Contrast-enhanced ultrasonography in the differentiation of retinal detachment and vitreous membrane in dogs and cats. *J. Small Animal Practice.* 2011; 52 (10): 522-30.
67. Larkin MA, Blackshields G, Brown NP, Chenna R, Mcgettigan PA, McWilliam H, Valentin F, Wallace IM, Wilm A, Lopez R, Thompson JM, Gibson TJ, Higgins DG. Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics.* 2007; 23, 2947-8.

68. Lindblad-Toh. Wade CM, Mikkelsen TS, Karlsson EK, Jaffe DB, et al.,
Genome sequence, comparative analysis and haplotype structure of
the domestic dog; *Nature*. 2005; 438 (7069): 803-19.
69. Lin JH. Drugs –drug interaction mediated by inhibition and induction of
P-glycoprotein. *Adv Drug Deliv Rev* 2003; 55 (1): 53-81.
70. Littlewood JD, Herrtage ME, Gorman NT, McGlennon NJ. von
Willebrand's disease in dogs in the United Kingdom.. *Vet Rec*. 1987;
121(20):463-8
71. Löscher W, Potschka H. Role of drug efflux transporters in the brain for
drug disposition and treatment of brain diseases. Review. *Prog
Neurobiol* 2005; 76 (1): 22-76.
72. Lubas G. Canine von Willebrand' s disease. I. Recent diagnostic
acquisitions [La Malattia de von Willebrand nel Cane. I. Recenti
Acquisizioni Diagnostiche]. *Veterinaria* 2002; 16: 1-13.
73. Marder VJ, Mannucci PM, Firkin BG, Hoyer LW, Meyer D. Standard
nomenclature for factor VIII and von Willebrand factor: a
recommendation by the International Committee on Thrombosis and
haemostasis. *Thromb Haemost*. 1985; 54: 871–2.
74. Marsili S, Genini S, Sudharsan R, Gingrich J, Aguiire GD, Beltran WA.
Exclusion of the unfolded protein response in light-induced retinal
degeneration in the canine T4R RHO model of autosomal dominant
retinitis pigmentosa. *PLoS One*. 2015 ;10(2):e0115723

75. Mattoso CR, Takahira RK, Beier S, Araújo Jr. JP, Corrente JE. Prevalence of von Willebrand disease in dogs from Sao Paulo State, Brazil. *J Vet Diagn Invest* 2010; 22: 55-60.
76. Mealey K, Munyard K, Bentjen S. Frequency of the mutant MDR1 allele associated with multidrug sensitivity in a sample of herding breed dogs living in Australia. *Vet. Parasitol.* 2005; 131: 193-6
77. Mealey K. Canine ABCB1 and macrocyclic lactones: Heartworm prevention and pharmacogenetics. *Veterinary Parasitology* 2008; 158: 215-22.
78. Mealey KL, Bentjen S, Waiting D. Frequency of the mutant MDR1 allele associated with ivermectin sensitivity in a sample population of Collies from the northwestern United States. *Am J Vet Res.* 2002; 63: 479-81
79. Mealey KL, Bentjen SA, Gay JM, Cantor GH. Ivermectin sensitivity in collies is associated with a deletion mutation of the *mdr1* gene. *Pharmacogenetics.* 2001; 11: 727-33.
80. Medleau L. Using ivermectin to treat parasitic dermatoses in small animals. *Vet Med.* 1994; 89: 770 - 4.
81. Mellanby RJ, Ogden R, Clements DN, French AT, Gow AG, Powell R. Population structure and genetic heterogeneity in popular dog breeds in the UK. *Vet J.* 2013; 196(1):92-7.
82. Metzker ML. Sequencing technologies - the next generation. *Nat Rev Genet.* 2010; 11 (1); 31-46.

83. Mizukami K, Yabuki A, Kohyama M, Kushida K, Rahman MM, Uddin MM, Sawa M, Yamato O. Molecular prevalence of multiple genetic disorders in Border collies in Japan and recommendations for genetic counselling. *Vet J.* 2016; 214:21-3.
84. Montgomery K, van der Woerd A, Cottrill N. Acute blindness in dogs: Sudden acquired retinal degeneration syndrome versus neurological disease. *Veterinary Ophthalmology.* 2008; 11 (5) 314-20.
85. Narfstróm K; Bjerkás E; Ekesten B. Disminución de la visión. In: *Oftalmología de Pequeños animales.* 3 ed. España, Ed. Elsevier. 2002; (5) 103- 76
86. Neff MW, Robertson KR, Wong AK, Safra N, Broman KW, Slatkin M, Mealey KL, Pedersen NC. Breed distribution and history of canine *mdr1-1Delta*, a pharmacogenetic mutation that marks the emergence of breeds from the collie lineage. *Proc Natl Acad Sci U S A,* 2004; 101(32):11725-30
87. Nei, M. *Molecular Evolutionary Genetics.* Columbia University Press. New York, USA. 1989, p12.
88. Hall N. Advanced sequencing technologies and their wider impact in microbiology. *The Journal of Experimental Biology.* 2007; (209): 1518-25
89. Nelson OL, Carsten E, Bentjen SA, Mealey KL. Ivermectin toxicity in an Australian Shepherd dog with the MDR1 mutation associated with ivermectin sensitivity in Collies. *J Vet Intern Med.* 2003; 17(3): 354-6.

90. Oliva R, Ballesta F, Oriola J, Clària J. *Genética Médica. Patrones de Herencia Monogénica*. Publicaciones i Edicions. Universitat de Barcelona- 3^a ed. Revisada: 2004
91. OMIA - omia.angis.org.au [homepage on the Internet]. Sydney: OMIA – Online Mendelian Inheritance in Animals [updated September 1, 2015; cited August 25, 2015]. Available from: <http://omia.angis.org.au/home>. Accessed September 2, 2015.
92. Packer RM, Hendricks A, Tivers MS, Burn CC. Impact of facial conformation on canine health: brachycephalic obstructive airway syndrome. *PLoS One*. 2015;10(10):e0137496.
93. Paczuski R. Determination of von Willebrand factor activity with collagen-binding assay and diagnosis of von Willebrand disease: Effect of collagen source and coating conditions. *J Lab Clin Med* 2002; 140: 250–4.
94. Palanova A. The genetics of inherited retinal disorders in dogs: implications for diagnosis and management. *Veterinary Medicine: Research and Reports*. 2016; 7: 41-51.
95. Parker HG, Kim LV, Sutter NB, Carlson S, Lorentzen TD, Malek TB. Genetic structure of the purebred domestic dog. *Science*. 2004. 304 (5674): 1160-4.
96. Patterson D. Companion animal medicine in the age of medical genetics. *J. Vet. Internal. Med.* 2000; 14: 1-9.
97. Pedersen PB, Nielsen CB, Heegaard S. Collie eye anomaly in blind Collie pups. *Dansk Veterinaertidsskrift*. 2004; 87:27-29.

98. Peral García P, Giovambattista G, Ripoli MV. Genética forense no-Humana. EDULP (Ed. Universidad de La Plata) 2015; 3: 90-2.
99. Perez Tort G, Sigal G, Ruiz F, Petetta L. Valoración de la eficacia terapéutica de la Ivermectina oral en la demodicosis canina generalizada refractaria a dosis de 600mcg/kg/día” Rev de Med Vet 2002; 83 (1): 28 – 9.
100. Pulliam J, Seward R, Henry R, Steinberg S. Investigating Ivermectina toxicity in Collies. Veterinary Research 1985; 80: 33-40
101. Rampazzo A, D’Angelo A, Capucchino MT, Sereno S, Peruccio C. Case Report: Collie eye anomaly in a mixed-breed dog. Veterinary Ophthalmology. 2005, 8 (5): 357 – 60.
102. Read MS, Shermer RW, Brinkhous KM. Venom coagglutinin: an activator of platelet agregation dependent on von Willebrand factor. Proc Natl Acad Sci, U S A. 1978; 75:4514–8.
103. Riehl J, Okura M, Mignot E, Nishino S. Inheritance of von Willebrand’s disease in a colony of Doberman Pinschers. Am J Vet Res. 2000; 61: 115-20.
104. Ristic Z, Medleau L, Paradis M, White-Weithers N. Ivermectin for treatment of generalized demodicosis in dogs. J Am Vet Med Assoc. 1995; 207(10):1308-10.
105. Roulet A, Puel O, Gesta S, Lepage JF, Drag M, Soll M, Alvinerie M, Pineau T. MDR1-deficient genotype in Collie dogs hypersensitive to the P-glycoprotein substrate ivermectin. Eur J Pharmacol. 2003; 460 (2-3): 85-91.

106. Rousset F, Raymond M. Statistical analysis of population genetic data: old tools, new concepts. *Trends Ecol. Evol.* 1997; 12: 313-317.
107. ROUSSET, F. Inferences from spatial population genetics. 2007 In: *Handbook of statistical genetics*, Balding DJ, Bishop M & Cannings C, 3rd ed. Wiley, Chichester, U.K.; 945-79
108. Ruggeri ZM, Zimmerman TS. The complex multimeric composition of factor VIII/von Willebrand factor. *Blood.* 1981; 57: 1140–3
109. Sancho-Pelluz J, Arango-Gonzalez B, Kustermann S, et al. Photoreceptor cell death mechanisms in inherited retinal degeneration. *Mol Neurobiol.* 2008;38(3):253–69
110. Schneider, S.; Roessli, D.; Excoffier, L.. Arlequin Version 2.000: A software for population genetics data analysis. Genetics and Biometry Laboratory, University of Geneva, Switzerland. [online] <http://www.cmpg.unibe.ch/software/arlequin/archive/website/software/2.000/manual/Arlequin.pdf>
111. Schrickx J, Fink-gremmels J. Implications of ABC transporters on the disposition of typical veterinary medicinal products. *Eur J Pharmacol.* 2008; 585 (2-3): 510-9
112. Servicio Nacional de Seguridad Agroalimentaria (SENASA) Sitio Web. <http://www.senasa.gob.ar/>. Acceso Abril 2018.
113. Sherman J. Understanding the impact of P-glycoprotein mutation on canine health. *The Vet. J.* 2011; 190: 13-14.
114. Sidjanin DJ, Miller B, Kijas J, McElwee J, Pillardy J, et al. Radiation hybrid map, physical map, and low-pass genomic sequence of the

- canine prcd region on CFA9 and comparative mapping with the syntenic region on human chromosome 17. *Genomics*. 2002; 81: 138–148
115. Smit JJ, Schinkel AH, Oude Elferink RP, Groen AK, Wagenaar E, van Deemter L, et al. Homozygous disruption of the murine *mdr-2* P-glycoprotein gene leads to a complete absence of phospholipid from bile and liver disease. *Cell* 1993; 75(3): 451-62.
116. Sosa P, Batista F, González MA, Bouza N. La Conservación Genética de las Especies Amenazadas en: *Biología de la Conservación de Plantas Amenazadas: Técnicas de Diagnóstico del Estado de Conservación*. Ed. Bañares A. Organismo Autónomo de Parques Nacionales, España. 2002; p133-160.
117. Stefanon G, Stefanon B, Stefanon G. Inherited and acquired canine bleeding disorders in Northeastern Italy. *Canine Pract*. 1993; 18: 15-23.
118. Stokol T, Parry BW. Canine von Willebrand disease: a review. *Aust Vet Pract* 1993; 23: 94 -103.
119. Stiedl C, Weber K. Fast and simple detection methods for the 4-base pair deletion of canine *MDR1 ABCB1* gene by PCR and isothermal amplification. *J Vet Diag Inv*. 2017; Vol. 29(2) 176-80.
120. Summers JF, Diesel G, Asher L, McGreevy PD, Collins LM. Inherited defects in pedigree dogs. Part 2: disorders that are not related to breed standards. 2010. *Vet J*. 183(1):39–45.

121. Sytsma, K.J. y B.A Schaal Genetic Variation, Differentiation, and Evolution in Species Complex of Tropical Shrubs based on Isozymic Data. *Evolution*; 1985 39: 582-93.
122. Tanigawar Y. Role of P-glycoprotein in drugs disposition. *Ther Drug Monit.* 2000; 22(1):137-40
123. Tappin S, Goodfellow M, Peters I, Day M, Vall E, Bentjen S, Mealey K. Frequency of the mutant MDR1 allele associated with multidrug sensitivity in dogs in the United Kingdom. *British Small Animal Veterinary Congress.* 2008.
124. Tappin S, Goodfellow M, Peters I, Day M, Vall E, L Mealey. Frequency of the mutant MDR1 allele in dogs in the UK. *Vet Rec.* 2012; 21(3); 171-2.
125. Triebaut F, Tsuruo T, Hamada H, Gottesman M, Pastan I, Willingham M. Cellular localization of the multidrug resistance gene product P-glycoprotein in normal human tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1987; (21):7735-8.
126. Valero MC; Hernández-Chico C. Comprendiendo una enfermedad hereditaria: Conceptos básicos de genética. *Asociación Española de Neurofibromatosis.* 2001. Cuadernillo 01.
127. Venta PJ, et al inventors; Board of Trustees Operating Michigan State University, assignee. DNA encoding canine von Willebrand Factor and methods of use. *United States Patent - US6074832A;* 2000 Jun 13.

128. Venta PJ, et al inventors; Board of Trustees Operating Michigan State University, assignee. DNA encoding canine von Willebrand Factor and methods of use. United States Patent - US6780583 B1; 2004 Jul 27.
129. Venta PJ, Li J, Yuzbasiyan-Gurkan V, Schall WD, Brewer GJ. Identification of a single-base deletion that causes Scottish Terrier von Willebrand's disease. *Anim Genet*; 1996; 27 (Suppl. 2) 49-50.
130. Villagrasa M. Atrofia Progresiva de retina. *Clínica Veterinaria de Pequeños Animales*. 1992; 12 (1): 7-8
131. von Willebrand E. A. Hereditar pseudohamofili. *Fin. Lakaresallsk. Handl*. 1926; 67: 7–12
132. von Willebrand E. A. Uber hereditre Pseudohamofilie. *Acta. Med. Scand*. 1931; 76: 521–50
133. Vos-Loohuis M, van Oost BA, Dangel C, Langbein-Detsch I, Leegwater PA. A novel VWF variant associated with type 2 von Willebrand diseases in German Wirehaired Pointers and German Shorthaired Pointers. *Anim Genet*. 2017; 48:493-6.
134. Wagner DD. Cell biology of von Willebrand factor. *Annu Rev Cell Biol* 1990; 6: 217–46.
135. Wagner R, Wendlberger U. Field efficacy of moxidectin in dogs and rabbits naturally infected with *Sarcoptes* spp, *Demodex* spp and *Psoroptes* spp mites. *Vet parasitol*. 2000; 93(2):149-58

136. Wang G-D, Zhai W, Yang H-C. Out of southern East Asia: the natural history of domestic dogs across the world. *Cell Research*; 2016. 26(1):21-33.
137. Wang Y, Cao J, Zeng S. Establishment of a P-glycoprotein substrate screening model and its preliminary application. *World J Gastroenterol* 2004; 10(9):1365-8.
138. Wayne RK, Ostrander EA. Lessons learned from the dog genome. *Trends in Genetics*; 2007. 23; 557–67.
139. Wessely-Szponder J. Choroba von Willebranda u psów – diagnostyka i post powanie. *Magazyn Wet.* 2001; 10 (6): 52–54.
140. Zangerl B, Goldstein O, Philp A, Lindauer S, Pearce-Kelling S, Mullins R, et al. Identical mutation in a novel retinal gene causes progressive rod–cone. 2006; *Genomics* 88; 551-63.
141. Zapata, C. La Variación Genética de las Poblaciones en: *Genética en Acuicultura*. Espinosa de los Monteros, J. y U. Labarta (Eds.). CAICYT; 1987; p33-53

ANEXOS

ANEXO 1. CONSENTIMIENTO INFORMADO

En el día de la fecha:...../...../.....

Yo,.....con DNI
Nro.....

Con domicilio en:

Calle:.....Nro:.....

...

Localidad:.....Pcia:.....

....

CP.....Teléfono.....

Tras haber recibido información verbal clara y sencilla sobre el procedimiento. Autorizo voluntariamente a la extracción de muestra de sangre entera con EDTA/Hisopado bucal (tache lo que no corresponda) del paciente:

Nombre.....Especie.....

...Sexo.....Raza.....Edad.....

.....Pelaje.....

Nro. de Historia Clínica.....

Para su utilización en (marcar con una x):

..... Estudio de asociación genómica de la Queratitis Superficial Crónica en la raza Ovejero Alemán.

..... Determinación de la mutación causal de Atrofia Progresiva de Retina.

..... Determinación de la mutación causal de Luxación de Cristalina Primaria

..... Determinación de la mutación causal de Gen de Resistencia a Multidrogas MDR1

..... Determinación de la mutación causal de La Enfermedad de von Willebrand tipo 1

A realizarse en el IGEVET (Instituto de Genética Veterinaria), Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata.

Firma:

Firma:

Aclaración:

Aclaración:

VETERINARIO

PROPIETARIO

ANEXO 2. PROTOCOLO DE TOMA Y ENVÍO DE MUESTRAS

La toma de la muestra debe ser realizada por un profesional veterinario que certifique la identidad del animal o material enviado, y debe acompañarse de la documentación correspondiente (cédula de tipificación, certificado de inscripción o identificación del animal, datos de filiación, oficio judicial, etc.). Para realizar los análisis las muestras deben reunir ciertas condiciones que dependen de su correcta toma, mantenimiento y transporte hasta el laboratorio, que se detallan a continuación:

Cualquiera sea el tipo de muestra que se desee analizar debe estar claramente identificada e individualizada en sobre, bolsa o tubo (según el caso) limpio y sellado.

2.1- Toma de muestra de Sangre:

- Para sacar sangre de la vena cefálica: Hay que colocar al animal en la mesa en posición de decúbito esternal. Una persona sujetará con una mano la cabeza agarrando el hocico y alejándolo del miembro que se va a utilizar. Con la otra mano tomará y estabiliza el codo desde el lado, comprimiendo la vena dorsalmente para visualizarla mejor. La compresión en la extremidad puede realizarse también con un torniquete. Para realizar la extracción de sangre la persona que la realiza estabilizará la pata y piel sobre la vena con la mano libre (la que no sujeta la jeringa). Se insertará la aguja acoplada a la jeringa (en algunas ocasiones puede recolectarse sangre por goteo) introduciendo la aguja como mínimo 1 cm

(0,5 cm en perros pequeños y gatos). Después de retirar la aguja se aplicará una gasa o una torunda de algodón sobre el sitio de la punción para, de esta manera, evitar la hemorragia y que aparezca un hematoma.

- Para sacar sangre de la vena safena: El animal se debe colocar en decúbito lateral con los miembros hacia la persona que sacará la sangre y con el lomo hacia el ayudante. Se deben sujetar los miembros anteriores, la cabeza y el miembro posterior que no va a ser usado para sacar sangre (el que está pegado a la mesa). Se sujetan los miembros anteriores y la cabeza tomando los carpos y estirándolos hacia delante mientras se estabiliza el cuello del paciente con el antebrazo de la misma mano. El ayudante sujetará el miembro posterior superior a nivel de la rodilla para estabilizar la pata y distender la vena para la inyección. La persona que realice la extracción sostendrá el miembro desde el tarso e insertará la aguja en la vena y extraerá la sangre. **(Figura 33)**

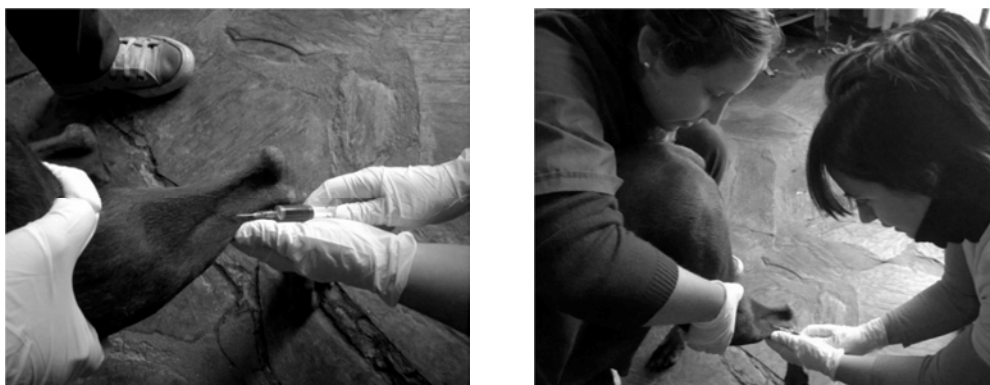


Figura 33. Toma de muestra de sangre de vena safena.

Brevemente, se debe seguir los siguientes pasos:

- a. Extraer una muestra de 2-5 ml de sangre con anticoagulante utilizando una aguja por animal. Mantener refrigerada la muestra durante la extracción y congelarla hasta su envío al laboratorio.
- b. Rotular debidamente los tubos con sangre.
- c. Un veterinario debe certificar el origen de la muestra.
- d. Adjuntar a las muestra los datos de los animales muestreados: Nombre, nº de FCA y chips si posee, Sexo, Raza, Color de pelaje, y Nombre del propietario.
- e. Enviar las muestras en forma refrigerada. Comunicar al laboratorio la fecha y forma de envío de las muestras.

2.2- Toma de muestra de hisopado bucal:

2.2.1- Protocolo de obtención de la muestra

Materiales: - 2 (dos) hisopos con punta de cepillo.

- 2 (dos) tubos cerrados con solución conservante

- Cortar la bolsa plástica en el extremo opuesto a la punta con el cepillo del hisopo.

- Sacar un hisopo del paquete poniendo atención a no tocar el cepillo.

- Frotar el extremo del hisopo con el cepillo sobre la parte interna de la mejilla, bajo la lengua y detrás de los labios. Haga esto durante 30 segundos por animal.

- Asegurarse de rotar el hisopo mientras frota.

- “Recordar que el fin es recoger células de la mejilla, no solo saliva, así que frote firmemente sobre los sitios anteriormente indicados”.**

- Repetir este procedimiento con ambos hisopos.

- Introducir el extremo del hisopo con el cepillo dentro del tubo que viene con el kit y cortar el mango de manera que este quede dentro del tubo y este se pueda cerrar nuevamente.

- Rotular cada tubo con los datos del animal.

- "Recordar que insuficiente material en el hisopo puede requerir una nueva toma y retrasar los resultados de la prueba".**

ANEXO 3 - MÉTODOS PARA ESTIMAR EL TIEMPO DE SANGRÍA

3.1- Método de Duke:

En el método de Duke, se pincha al paciente con una aguja especial o lanceta, preferentemente en el lóbulo auricular, luego de limpiarlo con alcohol. La punción es de 3-4 mm de profundidad. Se limpia la sangre con un papel de filtro cada 30 segundos. El test termina cuando cesa la hemorragia. El tiempo usual es de entre 2 y 5 minutos.

3.2- Sangrado en mucosa:

El paciente puede estar en cuadripedestación o recumbencia lateral, no se debe de usar sedación. Se dobla el labio inferior hacia arriba y con una Gaza se sujeta para causar congestión venosa. Se debe limpiar el área para quitar saliva y detritos, no usar alcohol ni otros agentes vasodilatadores. Usar una lanceta para hacer la incisión para iniciar el sangrado capilar. La profundidad del corte está estandarizada con este dispositivo. Se inicia el conteo desde que se hace el corte y se usa un papel absorbente para quitar el exceso de sangre. No se debe de tocar la herida. Detener el conteo cuando ya no hay sangrado. **(Figura 34)**



Figura 34. Toma de tiempo de sangría en mucosa.

ANEXO 4. PROTOCOLOS DE EXTRACCIÓN DE ADN

4.1 Protocolo de extracción de ADN a partir de sangre utilizando Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega, Madison, WI, USA)

- Cargar 900 ul de Solución de lisis celular en tubos estériles de 1,5 ml.
- Agitar el tubo con la muestra de sangre varias veces para homogeneizar la muestra y luego transferir 300 ul al tubo con la solución de lisis. Mezclar invirtiendo 5-6 veces.
- Incubar 10 minutos a T° ambiente (invirtiendo 2-3 veces en ese tiempo) para lisar los glóbulos rojos.
- Centrifugar 20 segundos a 14000 g a T° ambiente.
- Descartar el sobrenadante y agitar el pellet en el vortex 15 segundos para resuspender los glóbulos blancos. La eficacia de esta técnica depende de la correcta resuspensión de la muestra.
- Agregar a cada tubo 300 ul de la Solución de lisis nuclear. Cargar y descargar la pipeta en la solución 5-6 veces para homogeneizar la muestra y lisar así los glóbulos blancos. La solución se pondrá viscosa.
- Agregar a cada tubo 100 ul de Solución para precipitar proteínas. Agitar en vortex durante 10-20 segundos.
- Centrifugar a 14000 g por 3 minutos a T° ambiente. Se formara un precipitado marrón oscuro de proteínas y un sobrenadante con el ADN.

- Precipitación del ADN: Colocar en tubos limpios 300 ul de isopropanol a T° ambiente. Volcar en ellos el sobrenadante y descartar el tubo con el precipitado marrón.
- Mezclar la solución invirtiendo el tubo suavemente, varias veces hasta observar la formación de pequeños hilos de ADN.
- Centrifugar a 15000 g por 1 minuto a T° ambiente.
- Lavado del ADN: Descartar el sobrenadante volcando el tubo y agregar 300 ul de etanol 70 %. Hacer girar el tubo horizontalmente para lavar bien las paredes.
- Centrifugar a 15000 g por 1 minuto a T° ambiente.
- Aspirar el etanol cuidadosamente con una pipeta, evitando aspirar el pellet.
- Dejar el tubo destapado e invertido sobre un papel absorbente limpio durante 15 minutos.
- Agregar a cada tubo 100 ul de Solución de Rehidratación de ADN e incubar a 65° por una hora o a 37° por 24 horas.

4.2- Protocolo de extracción orgánica de ADN a partir de sangre periférica:

- Alicuotar 500 ul de la muestra de sangre en tubos de 1,5 ml.
- Lavar con 1000 ul de agua pura y centrifugar a 10000 g por 1 minuto.
- Descartar el sobrenadante volcando suavemente el tubo y secar sobre papel la última gota. Repetir el lavado una vez mas o hasta que el pellet quede blanco.
- Resuspender el pellet en 400 ul de Buffer de Extracción S (50mM de HCl-Tris, 25 mM de DTT, 2 % de N-Laurylsarcosine)
- Agregar 10 ul de proteinasa K (10 mg/ml) e incubar durante 3 horas a 55 °C o toda la noche a 37 °C.
- Llevar la muestra a temperatura ambiente y agregar 400 ul de cloroformo. Mezclar por inversión. Centrifugar a 10000 g por 1 minuto.
- Transferir la fase acuosa, que contiene el ADN (superior), a un nuevo tubo y descartar la fase orgánica.
- Repetir la extracción orgánica una vez más.
- Transferir la fase acuosa a otro tubo y agregar 80 ul de Acetato de Amonio 10M. Centrifugar a 10000 g por 1 minuto. Transferir la fase acuosa a otro tubo y agregar 800 ul de etanol 100 % (preenfriado). Mezclar suavemente, precipitar durante 1 hora en hielo o en el freezer (se puede dejar toda la noche).

- Centrifugar a 14000 g por 15 minutos. Luego descartar el sobrenadante volcando suavemente y secar la boca del tubo sobre papel.
- Lavar el tubo con 250 ul de etanol 70 % frio, centrifugar a 14000 g por 15 minutos y volver a descartar el sobrenadante.
- Secar el pellet a T° ambiente.
- Agregar 100 – 200 ul de agua pura e incubar toda la noche en un baño a 37 °C para hidratar el ADN.

4.3- Protocolos de extracción de ADN a partir de hisopos:

4.3.1- PBS – CHELEX (CHELEX ® 100 – Molecular Biology Grade Resin)

- Colocar 1 ml de PBS 1% en un tubo de 1,5 ml.
- Rotar el hisopo para que se desprendan las células.
- Centrifugar a 14000 g por 5 minutos.
- Descartar el sobrenadante y repetir el lavado.
- Agregar al pellet 750 ul de CHELEX
- Vortexear bien para homogeneizar la solución.
- Incubar 30 minutos a 56 °C en rotación.
- Hervir 8 minutos aproximadamente.
- Centrifugar a 13000 g por 1 minuto.

4.3.2- Buffer TEN

(Muestras conservadas en PBS)

- Agitar fuertemente contra las paredes interiores del tubo el hisopo con el objeto de desprender la mayor cantidad de células.
- Retirar el hisopo y descartarlo.
- Centrifugar a 10000 g por 2 minutos y eliminar el sobrenadante por inversión del tubo, cuidando de no remover el pellet de células.
- Terminar de eliminar el sobrenadante con una pipeta.
- Añadir 400 ul de Buffer 1X (1: 10 – Buffer 10X TEN: Agua Destilada) y resuspender las células con un toque de vortex.

Buffer 10X TEN: 100mM Tris - HCl pH 8, 10 mM EDTA, 2 M NaCl)

- Añadir 20 ul de SDS 10 % y 8 ul de proteinasa K 10 mg/ml.
- Vortexear para homogeneizar bien la muestra.
- Incubar 1 hora a 56 °C o toda la noche a T° ambiente.
- Centrifugar a 10000 g por 5 minutos.
- Recuperar el sobrenadante en un tubo nuevo y descartar el viejo con el pellet formado.
- Añadir 800 ul de etanol 100 % frio y homogeneizar mediante inversión del tubo.

- Incubar a -20°C toda la noche o 2 horas a -70°C.
- Centrifugar a 10000 g por 15 minutos y eliminar el sobrenadante por inversión.
- Añadir 500 ul de etanol 70 % frio y dar toque de vortex.
- Centrifugar a 10000 g por 15 minutos y eliminar el sobrenadante lo mejor posible.
- Sobre un papel absorbente dejar los tubos invertidos y abiertos hasta que se seque el excedente de alcohol.
- Añadir 30 ul de agua estéril.
- Vortexear para resuspender el pellet e incubar a 56 °C por 30 minutos o toda la noche a 37 °C.
- Conservar refrigerado.

4.3.3- QIAmp dna-Investigator kit

(COLOCAR EL HORNO 56 °)

- Colocar el hisopo en tubos de 2 ml.

(En caso de hisopos de algodón separar el algodón de la varilla que lo contiene con la mano o con tijeras)

- Agregar **20 µl deproteinasas K** y también **400 µl deBuffer ATL**. Cerrar el tubo y vortexear durante 10 segundos.

- Incubar a 56 ° C por un tiempo de 1 hora (rotando). En caso de usar bloques de calor o baños, vortexear el tubo 10 segundo cada 10 minutos para ayudar a la lisis.
- Centrifugar brevemente los tubos para remover las gotas de las paredes y del interior de la tapa.
- Agregar **400 µl de Buffer AL**, vortex por 15 segundos.

NOTA: CARRIER RNA. Agregar 1 µg disuelto en los **400 µl de Buffer AL. (POR MUESTRA)**

Para asegurarse la eficiencia de la lisis es fundamental que se mezcle bien la solución y sea homogénea.

- Colocar el tubo a **incubar a 70 ° C** durante 10 minutos, vortexear cada 3 minutos durante 10 segundos.
- Centrifugar brevemente el tubo para remover las gotas de las paredes y de la tapa.
- Agregar **200 µl de etanol** (96 – 100 %), cerrarlo y vortex por 15 segundos.

Para asegurar una unión eficiente en el paso 10, es esencial que la muestra y el etanol y se mezclen a fondo para producir una solución homogénea.

- Centrifugar brevemente el tubo para remover las gotas de las paredes y de la tapa.

- Transferir cuidadosamente la solución obtenida anteriormente a la columna del KIT tratando de no mojar la parte curva del tubo. **Centrifugar a 6000 g (8000 rpm)** por 1 minuto.

Descartar el tubo con lo que paso de la muestra. Colocar el tubo con la columna en un tubo de recogida.

Hasta 200 µl de lisado permanece en el hisopo. Para cosechar este lisado restante, colocar el hisopo en una columna de centrifugación QIA (no suministrado) y centrifugar a toda velocidad durante 2 min. Transferir el lysado por la columna sin mojar la parte curva del tubo, cerrar y centrifugar a 6000 g (8000 rpm) por 1 minuto.

- Abrir cuidadosamente la columna y agregar **500 µl de Buffer AW1** sin mojar la parte curva. Cerrar el tubo y centrifugar a 6000 g (8000 rpm) por 1 minuto. Colocar la columna en un tubo de recogida y desechar el tubo que contiene el flujo.

- Cuidadosamente abrir la columna de elusión y agregar **700 µl de Buffer AW2** sin mojar la parte curva. Cerrar y centrifugar a 6000 g (8000 rpm) por 1 minuto. Colocar el tubo con la columna en un tubo de recogida nuevo y descartar lo obtenido del flujo.

- Abrir cuidadosamente el tubo con la columna y agregar **700 µl de Etanol** (96-100 %). Cerrar y centrifugar a 6000 g (8000 rpm) por 1 minuto. Colocar el tubo con la columna en un tubo de recogida nuevo y descartar lo obtenido del flujo.

- Centrifugar a máxima velocidad (20000 g – 140000 rpm) por 3 minutos para secar la membrana completamente.
- Colocar el tubo de la columna en un tubo nuevo de 1,5 ml y descartar lo obtenido del flujo. Cuidadosamente abrir el tubo con la columna y dejar destapado a T° ambiente por 10 minutos o 3 minutos a 56 °C.
- Agregar **20 – 100 µl Buffer ATE o Agua Destilada** por el centro de la membrana.
- Cerrar e incubar a temperatura ambiente por 1 minuto. Centrifugar a máxima velocidad (20000 g – 140000 rpm) por 1 minuto.

La incubación de la columna QIA cargado con Buffer ATE o Agua Destilada durante 5 min a temperatura ambiente antes de la centrifugación generalmente aumenta el rendimiento de ADN.

ANEXO 5 - ANÁLISIS EN GEL DE AGAROSA

Preparación de geles de Agarosa 1 %

(volumen final 100 ml con Agua Destilada)

La preparación se agita y se coloca en el microondas o en autoclave hasta su disolución completa. Esta solución se coloca en moldes, se coloca un peine para que forme la fosas de siembra y se deja solidificar durante aproximadamente 1 hora.

Preparación de las muestras para su siembra

Se toman 3-5 μ l de la extracción de ADN y se le agregan 3 μ l de DYE, se mezcla y se coloca una por una en cada fosa en el gel. La corrida electroforética se realiza a 100 voltios, constantes durante 1 hora o hasta que el **DYE** haya migrado 3 o 4 cm.

Colorante DYE

- 0.025 g de Bromophenol Blue.
- 4 g de sacarosa.
- Completar hasta un volumen final de 100 ml con agua destilada.

Revelado de los geles

1. Se colocan 50 μ l de Bromuro de etidio en 500 ml de H₂O destilada.
2. Sumergir el gel en la solución por unos segundos.
3. Visualizar en un transiluminador de luz UV.

ANEXO 6 - CHEQUEO DE LOS AMPLIFICADOS EN GELES DE POLIACRILAMIDA

- Agua destilada 9 ml
- 3 ml TBE 5X (Tris Borato EDTA)
- 3 ml Acrilamida/Bisacrilamida 19:1
- 15 µl TEMED
- 150 µl APS

Procedimiento:

1. Limpiar los vidrios con alcohol para desengrasarlos.
2. Colocar los separadores (0,375 mm) sobre el vidrio entero y apoyar encima, con mucho cuidado, el vidrio calado. Sujetar con ganchos o clips.
3. Agregar el TEMED (Tetramethylethylenediamina) y el APS (Persulfato de amonio) a la mezcla de poliacrilamida, mezclar bien y proceder (desde el extremo calado) a cargar el gel con una pipeta de vidrio, evitando que se formen burbujas de aire.
4. Una vez que se llenó el molde con el gel, colocar el peine con cuidado.
5. Esperar que polimerice y montar en la cuba electroforética con TBE 1X. No dejar el gel polimerizado mucho tiempo sin montar para evitar la deshidratación.
6. Sembrar las muestras y correr a 170 watts durante el tiempo necesario.

TBE 5X:

- 54 g de Tris base.
- 27,5 g de Ácido Bórico.
- 20 ml de EDTA 0.5M (pH=8).
- Completar hasta 1000 ml con agua destilada.

Preparación de las muestras para su siembra

La muestra se siembra en el gel con colorante DYE, permitiendo así su visualización durante la corrida electroforética. Se toman 3µl del ADN genómico y se le agregan 1 µl de DYE, los 4 µl resultantes se colocan en los pocillos del gel. La corrida electroforética se realiza a 170 voltios durante 1 hora y cuarto.

Colorante DYE

- 0.025 g de Bromophenol Blue.
- 4 g de sacarosa.
- Completar hasta un volumen final de 100 ml con agua destilada.

Revelado de los geles

1. Se colocan 50 µl de Bromuro de etidio en 500 ml de H₂O destilada.
2. Sumergir el gel en la solución por unos segundos.
3. Visualizar el ADN en un transiluminador de luz UV.

ANEXO 7 - SECUENCIACIÓN

7.1- Purificación de las reacciones de PCR por precipitación con polietilenglicol (PEG) para secuenciación

Este protocolo está ajustado para reacciones de PCR de 50 μ l. Si el volumen de la PCR es diferente, modificar la escala manteniendo las proporciones.

1. Correr 5 μ l del producto de PCR en un gel de agarosa para verificar la amplificación.
2. Al resto de la reacción de PCR agregarle 50 μ l de una solución de 20% PEG - 2,5 MNaCl y mezclar bien.
3. Incubar a 37°C por 15 minutos.
4. Centrifugar a \sim 15.000 x g durante 15 minutos a temperatura ambiente.
5. Retirar el sobrenadante con pipeta y descartarlo. El pellet es incoloro y queda adherido a la pared del tubo.
6. Agregar 125 μ l de etanol 70%. Si se agrega el etanol en el fondo del tubo, centrifugar 2 minutos. Si se agrega el etanol suavemente por la pared del tubo, dejar reposar un minuto. Eliminar el sobrenadante y descartar. Eliminar la mayor cantidad posible del etanol.
7. Secar el pellet a 37°C durante 10-15 minutos. Asegurarse de que no queden restos de etanol y que el pellet esté seco. Un exceso en el secado del pellet dificulta la resuspensión.

8. Disolver el producto de PCR en 25 μ l de agua bidestilada estéril. Resuspender completamente el pellet (con pipeta o vortex). Ayuda incubar por unos minutos a temperatura ambiente o a 37°C.

Solución 20% PEG - 2,5 M NaCl

Para 50 ml mezclar:

- 10,0 g polietilenglicol 8000 (funciona igualmente con el PEG 6000 u 8000).
- 7.3 g de NaCl.
- Agregar 45 ml de agua bidestilada. Agitar y dejar disolver el PEG durante al menos 20 minutos. Se puede colocar la solución en un agitador a 37°C.

Cuando se disolvió el PEG (la solución se vuelve incolora), completar el volumen hasta 50 ml con agua bidestilada. Conservar a temperatura ambiente.

7.2- Protocolo a seguir para realizar las reacciones de secuenciación

Una reacción estándar se realiza en 10 μ l finales de acuerdo al siguiente protocolo:

- ADN (120-140 ng) + agua 5 μ l
- primer (5 μ M = 5 pmol/ μ l) 1 μ l
- premix (DYEnamic ET Dye Terminator) 4 μ l
- Total 10 μ l

7.3- Protocolo Precipitación con Acetato de Amonio

- Reacción de secuencia 10 μ l
- Acetato de amonio 7.5 M 1 μ l
- Etanol absoluto 30 μ l

1. Centrifugar a 15.000 rpm durante 15 minutos.
2. Descartar el sobrenadante.
3. Lavar con 100 μ l de etanol 70%, agregando el alcohol con suavidad para no despegar el pellet.
4. Dejar reposar 1 minuto y eliminar tanto etanol como sea posible (si quedaran gotas en las paredes, centrifugar brevemente y eliminarlas con la pipeta). Esto es importante ya que los restos de etanol producen artefactos en la corrida del secuenciador, denominados *dye blobs*.
5. Secar el etanol a 37°C durante aproximadamente 10 minutos. No secar excesivamente, ya que dificulta la resuspensión Del ADN.
6. Disolver el pellet en 10 μ l de MegaBACE Loading Solution mezclar vigorosamente con un vortex durante 20-30 segundos para asegurar una resuspensión completa.

ANEXO 8 - PIROSECUENCIACIÓN

8.1- Protocolos de amplificación:(volumen final 50 μ l)

Agua Destilada	24,48 μ l
Buffer	5 μ l
dNTP's	4 μ l
Mg	4 μ l
Primer – F (5 μ M)	5 μ l
Primer – R – M13 (5 μ M)	1 μ l
Primer – 13 – Biotin.	4 μ l
Taq. Polimerasa	0,52 μ l
ADN	2 μ l

8.2- Preparado de muestras para Pirosecuenciación

Luego de obtener el producto de PCR biotinilados se procedió a purificarlos utilizando el siguiente protocolo:

A) Preparación de Placa para purificación

1. Preparar la siguiente mezcla multiplicando por el número de muestras a pirosecuenciar:

X 1 muestra

Buffer de "binding"	40 μ l
Perlas de Sefarosa	3 μ l
H ₂ o	17 μ l
Volumen final	60 μ l

2. Mezclar muy bien antes de distribuir en la placa de purificación.

Evitar la decantación de las perlas de sefarosa.

Distribuir en cada fosa de la placa de Purificación:

Mezcla de binding	60 μ l
Producto de PCR	20 μ l

3. Tapar la placa con film. Incubar la mezcla por 5-10 minutos a temperatura ambiente mientras se agita a 1400 rpm.

4. Durante la incubación preparar la Placa para Pirosecuenciación.

B) Preparación de la Placa para Pirosecuenciación

1. Preparar la siguiente mezcla multiplicando por el número de muestras a pirosecuenciar:

X 1 muestra

Buffer de "annealing" 44,865 µl

Primer interno de secuenciación 0,135 µl

2. Distribuir 45 µl en cada fosa de la placa para Pirosecuenciación (PSQ).

C) Purificación

1. Con las perlas de sefarosa en suspensión, aspirar la solución usando la estación de purificación (Vacuum Prep Tool TM). De esta forma las perlas de sefarosa se adhieren al filtro de las puntas del soporte de aspiración.

Mantener las puntas dentro de la placa de PCR hasta verificar que toda la solución haya sido aspirada.

2. Transferir el soporte de aspiración a la primera cuba y aspirar el etanol 70 % por 5 segundos.

3. Transferir el soporte de aspiración a la segunda cuba y aspirar NaOH 0,2 M por 5 segundos para desnaturalizar el ADN.

4. Transferir el soporte de aspiración a la tercera cuba y aspirar el buffer de lavado (10 a 20 ml por placa) por 5 segundos.

5. Levantar el soporte de aspiración a una posición vertical para permitir que el líquido drene de las puntas. Retornar a la posición horizontal.

Colocar el soporte de aspiración sobre la placa de Pirosecuenciación (introduciendo las puntas en los pocillos sin tocar el líquido), apagar la bomba de aspiración y agitar suavemente para permitir que las perlas caigan en la placa PSQ.

6. Calentar la placa a 80° C por dos minutos para permitir el annealing del primer de secuenciación. Enfriar a temperatura ambiente.

7. Limpiar las puntas del soporte de aspiración agitándolo en la cuarta cuba que contiene agua Milli Q, con el fin de eliminar cualquier perla remanente.

8. Cuando todas las placas han sido preparadas, transferir el soporte de aspiración a la quinta cuba y aspirar el agua Milli Q por 20-30 seg. para lavar el soporte de aspiración.