



Facultad de Veterinaria  
**Universidad Zaragoza**



# Trabajo Fin de Grado en Veterinaria

Resistencia múltiple a drogas en perros:  
el gen MDR1

*Multi-drugs resistance in dogs:  
the gene MDR1*

**Autor:**

Teresa Etxarri Elizalde

**Directores:**

Dr. Luis Vicente Monteagudo Ibáñez  
Dra. María Teresa Tejedor Hernández

Facultad de Veterinaria  
2017

# **ÍNDICE**

<b>RESUMEN</b>	<b>2</b>
<b>SUMMARY</b>	<b>2</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b>	<b>3</b>
1. HISTORIA:	3
2. EL GEN <i>MDR1</i> Y LA GLICOPROTEÍNA P:	3
3. CONSECUENCIAS DE LA DELECIÓN:	5
4. FÁRMACOS IMPLICADOS EN REACCIONES ADVERSAS POR LA ALTERACIÓN DE <i>MDR1</i> :	8
5. RAZAS A LAS QUE AFECTA:	11
• Distribución de la mutación del gen <i>MDR1</i> en Europa:	11
6. PRUEBAS DIAGNÓSTICAS:	13
7. TRATAMIENTO:	14
<b>JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS:</b>	<b>15</b>
<b>MATERIAL Y MÉTODOS</b>	<b>15</b>
1. METODOS DE BUSQUEDA DE BIBLIOGRAFIA:	15
2. MÉTODOS DE LABORATORIO:	16
1.1.Material animal:	16
1.2.Toma de muestras:	16
1.3.Extracción de DNA:	16
1.4.Diseño de cebadores PCR:	16
1.5.Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR):	17
1.6.Comprobación de la amplificación en gel de electroforesis de agarosa.	
Formación del gel:	17
1.7.Secuenciación:	17
1.8.Alineación:	17
<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN:</b>	<b>18</b>
<b>CONCLUSIONES</b>	<b>20</b>
<b>CONCLUSIONS:</b>	<b>21</b>
<b>VALORACIÓN PERSONAL:</b>	<b>22</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA:</b>	<b>23</b>

## **RESUMEN**

La mutación del gen *MDR1* (Multi-Drug Resistance 1) provoca un déficit e incluso ausencia, de glicoproteína P, la cual se encarga del transporte de numerosos xenobióticos por el organismo, facilitando su eliminación e impidiendo que lleguen a órganos donde resultan tóxicos. Esta mutación produce numerosos efectos perjudiciales en numerosas razas caninas comunes. La relevancia de esta mutación radica en los graves efectos que produce en relación a la administración de fármacos de uso común en la clínica veterinaria.

En el presente trabajo también se estudia un caso de un Rottweiler con sintomatología similar a los individuos afectados por la mutación debido a reacciones adversas por la administración de fármacos sustratos de la glicoproteína P. Para ello, mediante muestras sanguíneas de los progenitores del animal afectado, se ha realizado extracción de ADN, amplificación mediante PCR, secuenciación y alineación, para comprobar la presencia o no de dicha mutación.

La mutación del gen de resistencia a múltiples drogas (*MDR1*) es un hallazgo relativamente reciente que precisa de un continuo estudio puesto que cada vez se obtienen nuevos datos que conllevan más medicamentos y más individuos afectados.

## **SUMMARY**

The mutation of the *MDR1* gene (Multi-Drug Resistance 1) causes a deficiency and even absence of glycoprotein P, which is responsible for the transport of numerous xenobiotics by the organism, facilitating their elimination and preventing them from reaching organs where they are toxic. This mutation produces numerous detrimental effects on a large number of common dog breeds. The relevance of this mutation lies in the serious effects it produces in relation to the administration of drugs commonly used in the veterinary clinic.

In the present research we also study a case of a Rottweiler with symptomatology similar to the individuals affected by the mutation due to adverse reactions by the administration of drugs substrates of the glycoprotein P. For this, through blood samples from the parents of the affected animal, DNA extraction, PCR amplification, sequencing and alignment were performed to verify the presence or absence of such mutation.

The mutation of the multidrug resistance gene (*MDR1*) is a relatively recent finding that requires a continuous study since new data are being obtained that entail more drugs and more affected individuals.

# **INTRODUCCIÓN**

## **1. HISTORIA:**

Las reacciones adversas a diferentes fármacos en numerosas razas de perros, debido a la mutación del gen *MDR1* (Multi-Drug Resistance 1), son ya conocidas desde los años 80, cuando se comenzaron a describir casos de reacción a los tratamientos con ivermectina (antiparasitario de uso corriente en perros) en razas como los Rough Collie (Paul *et al.*, 1987). A medida que fue aumentando el número de razas en las que se conocían dichas reacciones, se identificaron también nuevos fármacos de uso cotidiano en la clínica veterinaria canina que causaban reacciones adversas e incluso fatales.

Desde el primer momento se demostró que no todos los Collies, sino sólo parte de ellos, se intoxicaban por el efecto de la ivermectina. De hecho, una mínima fracción de la dosis habitual era suficiente para encontrar efectos adversos, que no se observaban generalmente en perros de otras razas (Paul *et al.*, 1987).

En el año 2001 se descubrió que la causa de esta sensibilidad es una mutación genética del gen *MDR1*, también conocido como gen *ABCB1* (ATP Binding Cassette Subfamily B Member 1) (Mealey *et al.* 2001), la cual produce un déficit, o incluso ausencia, de glicoproteína P (Gp-P), siendo ésta la encargada de transportar numerosos fármacos por el organismo facilitando su eliminación e impidiendo que lleguen a órganos como el cerebro o la placenta donde resultan tóxicos.

## **2. EL GEN *MDR1* Y LA GLICOPROTEÍNA P:**

En el perro, el gen *MDR1* o gen de resistencia múltiple a drogas, con entrada en GenBank NC\_006596.3, se localiza en el cromosoma 14. Este locus contiene 28 exones, y es el encargado de sintetizar la glicoproteína P (Gp-P) que contiene 1281 aminoácidos.

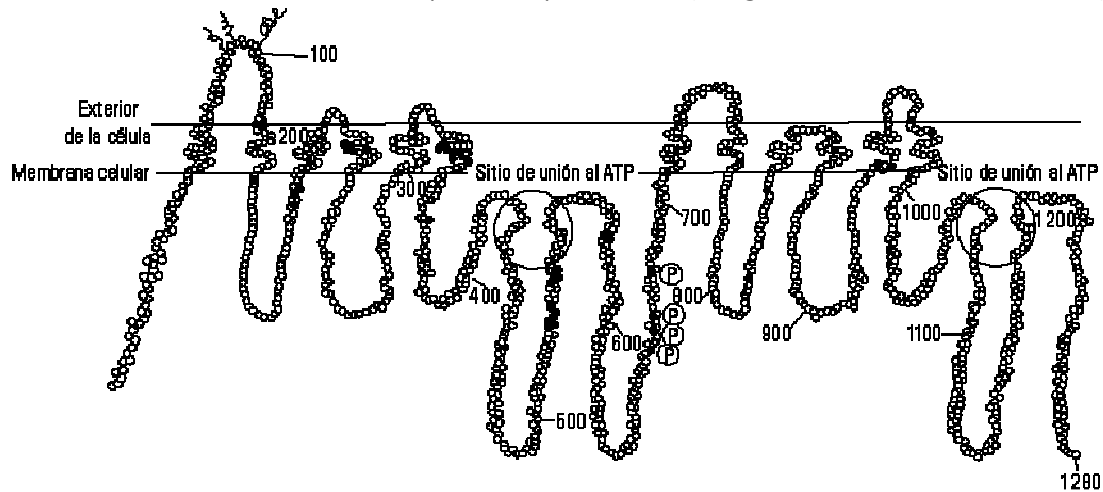
La glicoproteína P o glicoproteína de permeabilidad posee seis dominios transmembranas y dos sitios de unión a ATP que le proporcionan energía para exportar sustancias (Schinkel, 1999). La Gp-P transporta gran variedad de sustratos, la mayoría de ellos de más de 400-Da, básicos y con anillos aromáticos, aunque éstas no son características obligadas. Sin embargo, todas son sustancias hidrofóbicas y anfipáticas (Fromm, 2004).

Pertenece a la superfamilia de los transportadores transmembrana ABC (ATP Binding Cassette transmembrane transporter), siendo proteínas de membrana involucradas en el tráfico de sustratos dependiente de energía a través de la membrana celular (Figura 1). Se han identificado más de 50 miembros de dicha superfamilia a lo largo de toda la escala evolutiva (Higgins, 1992).

Los miembros de la superfamilia ABC comparten una topología básica que incluye diversos diseños aminoacídicos característicos. En general, contienen múltiples regiones amplificadoras de membrana seguidas por un dominio citoplasmático o cassette con diferentes tipos de unión ATP. Este tipo de organización se repite en algunos pero no todos de

los miembros, puesto que muchas proteínas ABC parecen consistir en dos mitades repetidas en tándem, en cada una de las cuales se aprecian múltiples elementos transmembrana seguidos por un cassette de unión ATP (Chen *et al.*, 1986; Gerlach *et al.*, 1986; Gros *et al.*, 1986; Higgins, 1992).

**Figura 1.** En la imagen se refleja la estructura de la Gp-P, compuesta por 1280 residuos y dos zonas de unión al ATP ubicadas en la parte citoplasmática. (Imagen tomada de German, 1996).



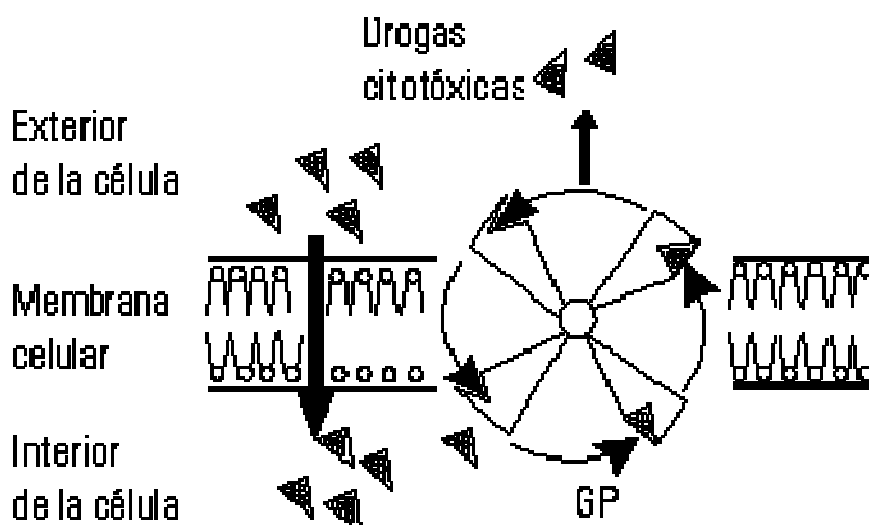
Concretamente pertenece a la subfamilia MDR/TAP, involucrada en la resistencia a múltiples fármacos, actuando de bomba de flujo dependiente de ATP para la salida de compuestos xenobióticos con amplia especificidad de sustrato (Figura 2). Es responsable de la disminución de la acumulación del fármaco en células resistentes a múltiples drogas, y a menudo interviene en el desarrollo de resistencia a los fármacos contra el cáncer (Joob and Wiwanitkit, 2016).

La Gp-P se encuentra en la membrana apical de los enterocitos (Schinkel, 1999), donde actúa conjuntamente con un grupo enzimático de los citocromos, el CYP3A4 (Citocromo P450 3A4), previniendo la entrada de xenobióticos desde la luz intestinal hacia el torrente circulatorio y además extrayendo sustancias desde la sangre y enviándolas a la luz del tracto digestivo (Fromm, 2003).

Adicionalmente, podemos encontrar Gp-P en la membrana de las células canaliculares biliares y en las células epiteliales tubulares proximales del riñón, donde se encarga de la excreción de xenobióticos y metabolitos hacia la bilis o la orina respectivamente (Thiebaut *et al.*, 1987).

Otros sitios donde está presente la Gp-P son las adrenales, los ductos pancreáticos (Thiebaut *et al.*, 1987), en linfocitos (Fromm, 2003), en la barrera hematotesticular (Fromm, 2004) y mayoritariamente en la barrera hemoencefálica, a nivel de las células de los capilares cerebrales, evitando allí el ingreso de sustancias potencialmente dañinas para el tejido nervioso (Schinkel, 1999; Fromm, 2000). Se expresa también en la placenta, impidiendo el ingreso de xenobióticos al feto; sin embargo, en esta ubicación, la cantidad de Gp-P depende básicamente de la expresión genética del feto y no de la madre (Lankas *et al.*, 1998).

**Figura 2.** Mecanismo de acción de la glicoproteína P en la eliminación de xenobioticos (Imagen tomada de Heyden et al., 1995).



### 3. CONSECUENCIAS DE LA DELECIÓN:

La mutación causante de las reacciones adversas mencionadas, consiste en la pérdida (delección) de cuatro nucleótidos del ADN de la secuencia del gen *MDR1*, concretamente en el exón 4, con notación nt230(del4) (Mealey et al., 2001).

La secuencia del gen normal y la del gen mutado son, por tanto, idénticas al 99,9% pero la delección de 4 pares de bases causa la pérdida de una secuencia GATA en el exón 4, originando un codón de terminación prematuro, por lo que este gen mutado produce una proteína de 91 aminoácidos, que difiere totalmente de los 1281 aminoácidos que tiene la Gp-P habitualmente (Figura 3A y 3B), siendo este producto del gen mutado totalmente afuncional, (Klitzsch et al., 2010; Roulet et al., 2003).

Las mutaciones observadas en estudios previos en los cánidos tienen como resultado la disminución o eliminación de la función de la glicoproteína P, lo que les hace ser más sensibles a los compuestos xenobióticos y a los fármacos que son sustratos de dicha glicoproteína, ya que aumenta su concentración en el organismo (Mealey and Merus, 2008).

En los perros mutantes, se necesitan niveles muy inferiores de cortisol plasmático para provocar una retroalimentación negativa que bloquee el eje Hipotálamo-Hipófisis (eje HHA). Como consecuencia, los perros homocigotos para la mutación presentan una mala tolerancia al estrés que puede agravar las consecuencias de las reacciones adversas (Martinez et al., 2008; Mealey, 2004; Mealey et al., 2007).

La alteración de la función de la Gp-P en la barrera hematoencefálica causa un incremento de la concentración de drogas en el cerebro (por ejemplo de ivermectina) acompañado de síntomas neurotóxicos. Cuando la misma droga es administrada a diferentes

perros, la intensidad de los síntomas varía en función del genotipo del animal, sí el perro posee un alelo normal, o silvestre, y un alelo mutante, puede sintetizarse por completo Gp-P, pero esto no ocurre cuando ambos alelos contienen la mutación en el gen *ABCB1* (Mealey and Merus, 2008).

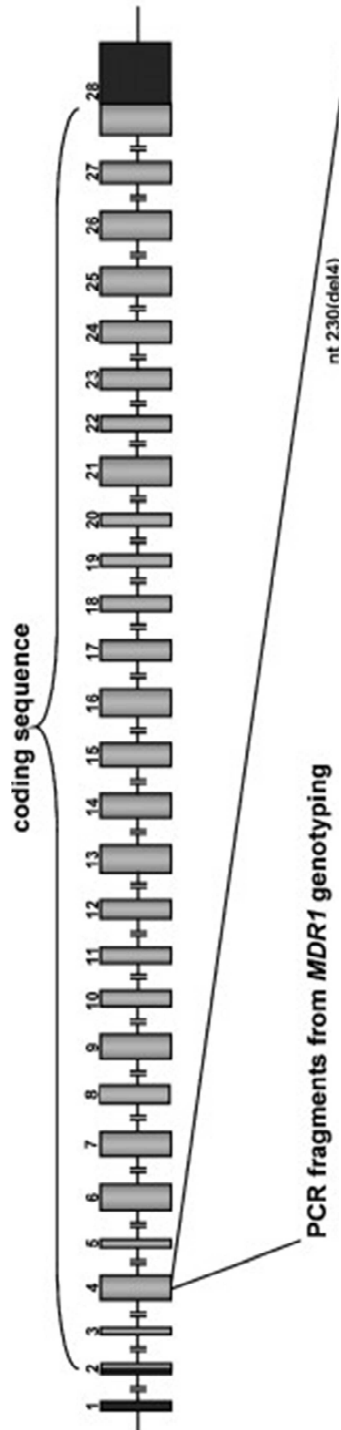
Este defecto sigue un patrón de herencia autosómica recesiva, siendo recesivo el alelo mutante que codifica la Gp-P afuncional y dominante el alelo salvaje, pero esta dominancia no es completa, ya que los heterocigotos (-/+) son capaces de sintetizar Gp-P funcional pero en menor cantidad, mientras que los homocigotos (-/-) no son capaces de sintetizar Gp-P funcional.

Para que un individuo muestre alteraciones debe ser heterocigoto (-/+) y homocigoto para la mutación (-/-). En este último caso, ambos progenitores deben ser al menos heterocigotos para la mutación, mientras que en un individuo heterocigoto, basta con que uno de los progenitores se al menos portador de la delección (Pierce, 2015).

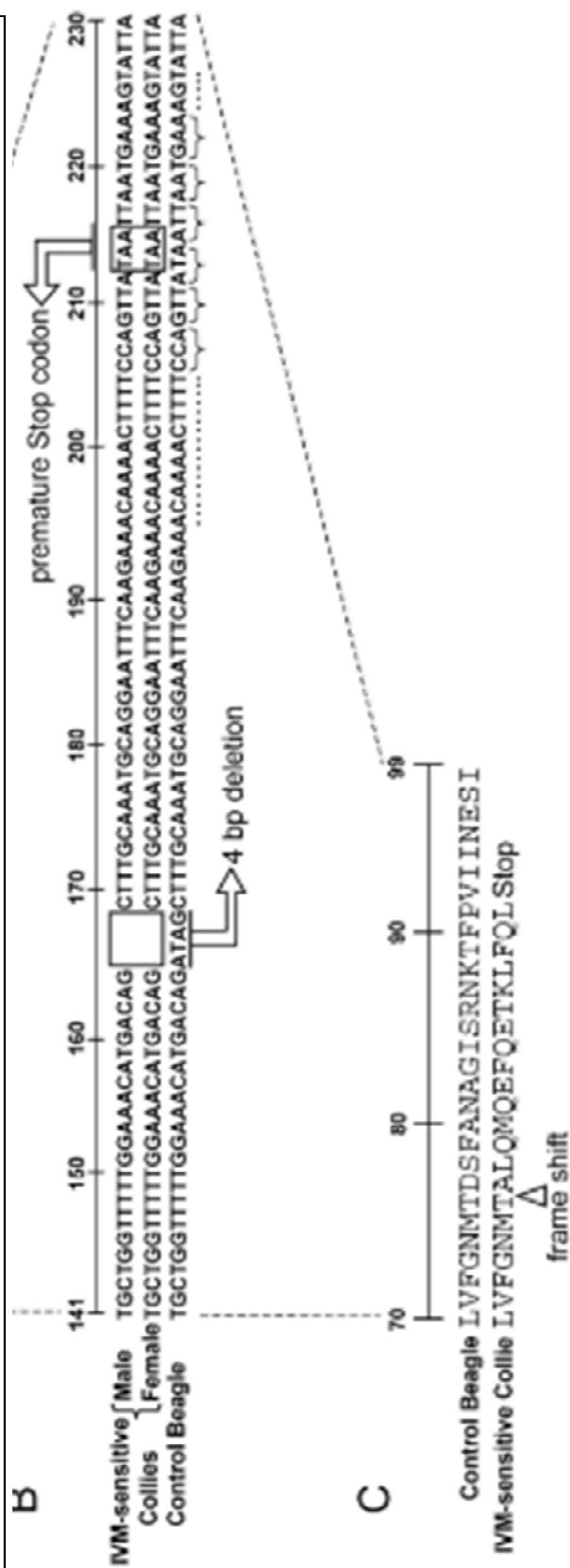
Las alteraciones en la expresión de Gp-P en placenta exponen a los fetos a niveles más altos de xenobióticos y por consiguiente, a mayor probabilidad de malformaciones (Fromm, 2004). Cuando se trataron hembras de ratón *MDR1* (-/-) con un homólogo de la ivermectina, nacieron con paladar hendido el 100 % de los fetos homocigotos para la mutación, el 30 % de los heterocigotos y el 0 % de los que no tenían la mutación (Lankas *et al.*, 1998).

Recientemente, se ha descubierto que existen cambios fisiológicos en la expresión de Gp-P que van asociados a la edad, mostrando que en perros mayores de 100 meses, disminuye un 72% la expresión de Gp-P cerebral con respecto a los perros menores de 36 meses. Se sabe que los pacientes de mayor edad tienen más tendencia a sufrir reacciones adversas a medicamentos y se asumía que el incremento en los niveles plasmáticos era debido a disfunciones renales y hepáticas que alteraban los procesos de excreción, sin embargo, estos estudios sugieren que alteraciones en los mecanismos de eflujo de la barrera hematoencefálica pueden estar altamente implicados en las reacciones medicamentosas adversas de pacientes geriátricos (Pekcec *et al.*, 2011).

**Figura 3A.** Estructura del gen MDR1 señalando la posición aproximada de la delección causante. Imagen tomada y adaptada de Roulet et al. 2003.



**Figura 3B.** Secuencia de la región afectada por la delección y sus consecuencias sobre la secuencia de aminoácidos de la proteína. Imagen tomada y adaptada de Roulet et al. 2003.





#### 4. FÁRMACOS IMPLICADOS EN REACCIONES ADVERSAS POR LA ALTERACIÓN DE *MDR1*:

Se ha demostrado que varios tipos de drogas como antiparasitarios, quimioterápicos, inmunosupresores, hormonas esteroides, opioides, anti-heméticos y otros, son transportados por la glicoproteína P en la mayoría de los mamíferos (Mealey, 2004; Zhou, 2008). Este número probablemente aumente, ya que numerosas drogas aún no han sido estudiadas como sustrato de la Gp-P (Mealey *et al.*, 2001; Nelson *et al.*, 2003; Roulet *et al.*, 2003; Geyer *et al.*, 2005a, 2007).

- **Ivermectina:** La ivermectina es una lactona macrocíclica semisintética que se origina a partir de *Streptomyces avermitilis* y potencia la actividad de los canales iónicos dependientes de glutamato o de ácido aminobutírico (GABA) (de Silva, 1997).

En los mamíferos, las neuronas sensibles a GABA, que están restringidas al Sistema Nervioso Central, están protegidas de la exposición a la ivermectina por la glicoproteína P en la barrera hematoencefálica, evitando que el fármaco acceda al cerebro, siendo en general, seguro para su uso en mamíferos. (Schinkel *et al.*, 1994, 1996). Sin embargo, en parásitos invertebrados como nematodos y artrópodos, las neuronas sensibles a la ivermectina están ampliamente distribuidas. Cuando hay ausencia de Gp-P, y no hay protección frente a ivermectina, la exposición a dicha lactona macrocíclica resulta en parálisis tónica y finalmente en la muerte del organismo. Este efecto selectivo en parásitos invertebrados ha hecho que sea uno de los principales medicamentos en medicina veterinaria y humana con uso muy extendido como antiparasitario interno y externo (Campbell, 1993; Campbell and Benz 1984).

La acumulación de ivermectina en el cerebro produce síntomas nerviosos como midriasis, salivación, somnolencia, depresión, desorientación, ataxia, temblores, coma e incluso la muerte (Fecht *et al.* 2007; Geyer and Janko, 2012).

Un perro sin la mutación mostrará concentraciones de estos fármacos en cerebro entre 1/10 y 1/100 de las que se encuentran en plasma, mientras que en un perro sin Gp-P se obtendrán valores veinte veces superiores en cerebro comparados con las cifras plasmáticas (Geyer *et al.* 2005 a y b). Así pues, un perro sin la mutación, tolera dosis de ivermectina de 2500mcg/kg sin exhibir toxicidad, un heterocigoto sufre toxicidad si recibe dosis seriadas de 600mcg/kg, mientras un homocigoto para la mutación sufrirá toxicosis grave con una dosis única de 120mcg/kg (Mealey, 2008). Debido a que una sola dosis de ivermectina es suficiente para mantener niveles plasmáticos del fármaco durante 25 días, las dosis seriadas se convierten en potencialmente peligrosas para los heterocigotos (Gokbulut *et al.* 2006).

La intoxicación con ivermectina es de importante consideración ya que numerosos fármacos antiparasitarios como el comercializado bajo el nombre

“Ivomec” lo contienen, y son de uso común tanto por veterinarios como por propietarios, sin necesidad de una receta previa.

- **Milbemicina:** La milbemicina se considera segura para heterocigotos (Barbet *et al.*, 2008). La intoxicación por moxidectina solo se ha descrito en el Pastor Australiano y se sospecha que además de la mutación *ABCB1*, la alteración en otros receptores como el *ABCG2* (antes *BCRP*) (Schricks and Fink-Gremmels, 2008) y la alteración en la expresión de *CYP3A* (Sherman, 2011) puedan estar involucrados.
- **Loperamida:** La loperamida es un opioide que disminuye el peristaltismo al ocupar receptores periféricos, pero que, en principio, no posee efectos centrales, dado que la barrera hematoencefálica la mantiene alejada de los receptores cerebrales. En ratones en los que se ha eliminado la secuencia *MDR1*, una dosis de loperamida logra niveles cerebrales del fármaco 10 veces superiores a la de ratones no mutados, con signos como excitación, caminar en círculo y cola erecta (Schinkel, 1999). En el Collie, asociada a la delección ya referida, también se describe frecuentemente intoxicación por loperamida, con signos de sobredosis de opioides como salivación, depresión, ataxia, debilidad y coma (Kitamura *et al.*, 2008; Hugnet *et al.*, 1996; Sartor *et al.*, 2004).
- **Domperidona:** La domperidona es un antagonista dopaminérgico que actúa como antiemético al bloquear receptores periféricos; cuando se administra a ratones *MDR1* (-/-) estos se tornan severamente letárgicos (Schinkel, 1999).
- **Citotóxicos:** Algunos citotóxicos que son sustratos de Gp-P como Vincristina, Vinblastina, Doxorubicina, Dactinomicina y Taxanos, causan importante toxicidad hematológica e intestinal en perros homocigotos para la delección en *ABCB1* y de riesgo moderado en individuos heterocigotos (Schricks and Fink-Gremmels, 2008; Mealey *et al.*, 2003; Vail, 2009).

En perros con la mutación (tanto homocigotos como heterocigotos) tratados con Vincristina a dosis normales, el 75% desarrollaron neutropenia y el 62,5% trombocitopenia, mientras que en portadores del alelo salvaje, la neutropenia fue del 11% y la trombocitopenia del 4% (Mealey *et al.*, 2008a). Se cree que la mayor responsable de este incremento altamente significativo de la toxicidad es una drástica disminución en la excreción biliar de estos medicamentos (Coelho *et al.*, 2009). De la misma manera, la ausencia de Gp-P en riñón incrementa la nefrotoxicidad de la doxorubicina (Martinez *et al.*, 2008) y se recomienda que todo perro que sea de una de las razas en donde se ha encontrado la mutación, sea genotipado antes de iniciar un protocolo de quimioterapia (Vail, 2009).

- **Digoxina:** La absorción de digoxina en intestino está altamente influenciada por la presencia de Gp-P (Schricks and Fink-Gremmels, 2008); se han dado casos de perros *ABCB1* que muestran abundantes vómitos y anorexia tras dosis habituales de digoxina, así como estados de confusión, ataxia y cambios de comportamiento con dosis terapéuticas de Mexiletina (Henik *et al.*, 2006).

- **Acepromacina y butorfanol:** También se han dado casos de depresión respiratoria severa en estos perros con el uso de acepromacina y butorfanol (Martinez *et al.*, 2008).

Además de la lista de medicamentos mencionados hay que tener en cuenta que en pacientes heterocigotos o incluso en aquellos sin la mutación, se puede disminuir enormemente la cantidad de Gp-P por fármacos que inhiben su expresión (Mealey *et al.*, 2008b). La actividad de la Gp-P puede ser inhibida farmacológicamente por fenómenos de regulación transcripcional o postranscripcional, mediante procesos que alteran la estabilidad de mRNA (Menez *et al.*, 2012).

También hay que tener en cuenta los fenómenos de comedición, ya que se han reportado casos de intoxicaciones en perros heterocigotos y en perros sin la mutación, por la combinación de Milbemicina con Ketoconazol (Sherman, 2011), Ivermectina con Ketoconazol y Digoxina con Verapamilo (Schrickx y Fink-Gremmels, 2008).

**Tabla 1.** Fármacos sustratos de Gp-P y fármacos inhibidores de Gp-P (Tabla tomada de Correa y Castaño, 2014).

FÁRMACOS SUSTRATOS DE GP-P
<b>Antiemético y manejo gastrointestinal</b> → Ondansetron, Domperidona, Loperamida, Cimetidina, Ranitidina.
<b>Hormonales</b> → Dexametasona, Metilprednisolona, Aldosterona, Cortisol Hidrocortisona, Estradiol.
<b>Antiinfecciosos</b> → Eritromicina, Rifampina, Tetraciclina, Doxiciclina, Levofloxacina, Sparfloxacina, Grepafloxacina, Nelfinavir, Indinavir, Saquinavir, Amprenavir, Ritonavir, Itraconazol, Ketoconazol, Ivermectina, Meloxidectina, Selamectina, Milbemicina.
<b>Antineoplásicos</b> → Doxorrubicina, Paclitaxel, Docetaxel, Etoposido, Imatinib, Diltiazem, Mibefradil, Verapamilo, Digitoxina, Quinidina, Atorvastatina, Lovastatina, Losartan.
<b>Cardiovascular</b> → Digoxina, Bunitrolol, Carvedidol, Celiprolol, Talinolol, Diltiazem, Mibefradil, Verapamilo, Digitoxina, Quinidina, Atorvastatina, Lovastatina, Losartan.
<b>Otros</b> → Ciclosporina A, Sirolimus, Tacrolimus, Fexofenadina, Terfenadina, Amitriptina, Colchicina, Morfina, Vecuronio, Acepromacina, Butorfanol, Fenitoina.
FÁRMACOS INHIBIDORES DE GLICOPROTEÍNA P
Fluoxentina, Paraxentina, Hierba de San Juan, Metadona, Pentazocina, Verapamilo, Amiodarona, Carvedilol, Quinidina, Niacardipino, Eritromicina, Itraconazol, Ketoconazol, Ciclosporina, Tacrolimus, Bromocriptina, Clorpromacina, Tamoxifen, Jugo de Toronja.

## 5. RAZAS A LAS QUE AFECTA:

Hasta la fecha, estudios sobre el genotipo indican que muchas razas se ven afectadas por la mutación del gen MDR1, incluidos el Pastor Australiano (Australian Shepherd), Pastor Australiano Miniatura (Miniature Australian Shepherd), Pastor Escocés (Shetland Sheepdog), Pastor Aleman (German Shepherd), Pastor Blanco Suizo (White Swiss Shepherd), Viejo pastor Inglés (Old English Sheepdog o Bobtail), Pastor Inglés (English Shepherd), Wäller, Whippet de Pelo Largo (Longhaired Whippet), Silken Windhound, Border Collie y McNab (Geyer *et al.* 2005b; Gramer *et al.* 2011; Mealey *et al.* 2005; Neff *et al.* 2004).

La mayoría de las razas implicadas en la mutación son pastores, pero también aparecen razas como los Whippet de pelo largo, que aparentemente no son pastores pero en cuyos orígenes, se incluyeron pastores. En definitiva, se apunta a un posible progenitor común pastor que aportó la mutación en la fundación de cada una de estas razas.

- **Distribución de la mutación del gen MDR1 en Europa:**

En 2016 se publicó un estudio acerca de la prevalencia de la mutación *ABCB1* en numerosas razas de perros en diferentes países de Europa (Firdova *et al.*, 2016).

El objetivo del estudio fue determinar la frecuencia de la mutación del alelo mediante la revisión del genotipado recogido en bases de datos de 13 países europeos durante (Australia, Bélgica, República Checa, Dinamarca, Finlandia, Francia, Alemania, Hungría, Países Bajos, Polonia, Eslovaquia, España y Reino Unido), en seis razas de perros:

- Rough Collie
- Smooth Collie
- Border Collie
- Shetland Sheepdog (Pastor Escocés)
- Australian Shepherd (Pastor Australiano)
- White Swiss Shepherd (Pastor Blanco Suizo)

Las muestras de DNA procedente de sangre y raspado bucal disponibles en la base de datos fueron obtenidas por los propietarios y criaderos en cooperación con veterinarios entre 2012 y 2014, sumando un total de 4729 muestras.

**Tabla 2.** Distribución del genotipo *ABCB1* en las poblaciones estudiadas. Tabla tomada de Firdova *et al.*, 2016.

Dog breed	Number of analyzed samples	Frequency of mutant allele (%)	Genotype (%)		
			<i>ABCB1</i> (wt/wt)	<i>ABCB1</i> (wt/del)	<i>ABCB1</i> (del/del)
Rough Collie	1310	48.3	28.3	46.9	24.8
Smooth Collie	389	58.5	20.6	41.9	37.5
Shetland Sheepdog	1400	30.3	48.6	42.4	9
Australian Shepherd	907	35	41.2	47.5	11.3
Miniature Australian Shepherd	92	26.1	53.9	40	6.1
Silken Windhound	105	28.1	47.6	48.6	3.8
Longhaired Whippet	138	24.3	52.2	47.1	0.7
White Swiss Shepherd	234	16.2	68.4	30.8	0.8
Border Collie	116	0	100	0	0
Akita-Inu	38	0	100	0	0

En la tabla 2 se puede observar que las razas Rough Collie y Smooth Collie poseen las frecuencias más elevadas, llegando a ser éstas del 48.3% y del 58,5% respectivamente. Sin embargo en las razas Border Collie y Akita Inu no se encontró mutación en dichas poblaciones.

En este trabajo también se estudia la posible presencia de la mutación en la raza Akita-Inu, de la cual no había datos bibliográficos sobre la presencia del gen *MDR1* hasta el momento, pero veterinarios aconsejan realizar el test de para la mutación *ABCB1* para perros de raza Akita-Inu por una posible introgresión de dicho gen a raíz de perros pastores.

Para estudiar esta hipótesis se testaron 38 ejemplares de Akita-Inu, resultando todos homocigotos para el alelo salvaje (w/t, wild type) *ABCB1*.

**Tabla 3.** Frecuencia de los alelos *ABCB1* en cuatro razas de perros susceptibles en diferentes países de Europa. Collie (Rough Collie y Smooth Collie), Shetland Sheepdog, Australian Shepherd y White Swiss Shepherd. Tabla tomada de Firdova et al. 2016.

Dog breed	Origin (state)	Number of analyzed samples	Frequency of mutant allele (%)	Genotype (%)		
				<i>ABCB1</i> (wt/wt)	<i>ABCB1</i> (wt/del)	<i>ABCB1</i> (del/del)
Collie	Czech Republic	346	50	24	46.8	29.2
	Germany	258	35.1	43	43.8	13.2
	Finland	214	60.7	17.8	43	39.2
	U.K.	184	50.5	27.2	44.6	28.2
	France	182	53.6	22	48.9	29.1
	Hungary	98	61.2	16.3	44.9	38.8
	Poland	79	55	21.5	46.8	31.7
Shetland Sheepdog	France	511	34.7	42.7	45.2	12.1
	Czech Republic	247	25.9	51.4	45.3	3.3
	Poland	136	39.3	56.6	8.1	35.3
	Germany	91	17.6	64.8	35.2	0
	Spain	86	30.8	46.5	45.3	8.2
	Netherlands	57	36	43.9	40.4	15.7
	Austria	55	14.5	74.5	21.8	3.7
	Finland	39	30.8	51.3	35.9	12.8
	Hungary	25	36	32	64	4
	France	223	33.6	41.7	49.3	9
Australian Shepherd	Czech Republic	195	35.9	39	50.2	10.8
	Poland	90	45	26.7	56.7	16.6
	Austria	90	25	57.8	34.4	7.8
	Germany	87	34.5	42.5	46	11.5
	Belgium	49	29.6	46.9	46.9	6.2
	Hungary	24	39.6	37.5	45.8	16.7
	Denmark	93	18.8	62.4	37.6	0
White Swiss Shepherd	Spain	37	9.5	81	19	0
	Poland	31	24.2	64.5	29	6.5
	Slovakia	16	18.75	62.5	37.5	0
	Hungary	12	12.5	75	25	0
	France	10	20	60	40	0

La distribución del genotipo *ABCB1* en Collies en Europa parece ser estable en los últimos años excepto en Alemania, donde la frecuencia alélica de *ABCB1* disminuye del 55% al 35.1% (Geyer et al., 2005a; Gramer et al., 2011). Esto puede ser debido a las estrategias de cría o al tamaño de muestra que es más reducido.

La frecuencia alélica para la mutación *ABCB1* en el Pastor Escocés en Alemania en el año 2016 es más baja que la obtenida en el estudio de Geyer (Geyer et al., 2005a) o Gramer (Gramer et al., 2011), y no se encuentran homocigotos mutantes. Estos datos pueden ser, al igual que en el Collie, por la reducida población muestreada.

Por el contrario, la frecuencia en el Pastor Australiano ha aumentado a 34,5% en comparación con 20% y 22% observadas en los trabajos de Geyer y Gramer (Geyer *et al.*, 2005a; Gramer *et al.*, 2011).

Destacar que no se ha detectado mutación *ABCB1* en Border Collie, concordando con los datos de otros estudios de (Geyer *et al.*, 2005a; Gramer *et al.*, 2011; Mealey y Merus, 2008; Neff *et al.*, 2004).

A gran escala se puede considerar que la prevalencia de la mutación *ABCB1* a nivel europeo sigue constante y se extiende en países en los que no había estudios hasta el momento. Esto es así porque no se ha aplicado selección en contra de esta mutación.

Por ejemplo, en razas como el Rough Collie, no hay una restricción de cría para criadores asegurados por el Kennel Club, sino que únicamente se considera recomendable realizar la prueba de DNA para *MDR1*, al igual que ocurre en el Smooth Collie y en el Pastor Australiano (Australian Shepherd) en los que está fuertemente recomendado, o en el Pastor Escocés (Shetland Sheepdog) en el que únicamente se sugiere considerar la posibilidad de practicar la prueba de control (British Kennel Club, [www.thekennelclub.org.uk/](http://www.thekennelclub.org.uk/), última visita el 12 de Junio de 2017). Podríamos comparar estas recomendaciones con las restricciones descritas para estas razas para el gen Merle, en las cuales se exige que ambos progenitores no sean portadores del gen Merle para poder registrar los cachorros de una camada en el Kennel Club.

Debe tenerse en cuenta que el grupo de los pastores ingleses está afectado por alteraciones genéticas consideradas más graves, como CEA (Collie Eye Anomaly o Anomalía del Ojo del Collie) o PRA (Progressive Retinal Atrophy o Atrofia Progresiva de la Retina) (Kukekova *et al.*, 2009; Lowe *et al.*, 2003), cuyo control genético es, por el momento, prioritario para los clubs de criadores.

A la vista de las frecuencias expuestas en la Tabla 2 y en la Tabla 3, las medidas de selección aplicadas deberían además, tomar las precauciones oportunas para evitar comprometer el tamaño efectivo de las poblaciones.

## **6. PRUEBAS DIAGNÓSTICAS:**

Actualmente hay diferentes métodos de genotipado desarrollados para detectar la mutación de la delección de 4 pares de bases. (Baars *et al.*, 2008; Geyer *et al.*, 2005b; Hugnet *et al.*, 2004; Kawabata *et al.*, 2005; Klintzsch *et al.*, 2010; Mizukami *et al.*, 2012; Neff *et al.*, 2004; Roulet *et al.*, 2003). Estos métodos están basados principalmente en la amplificación mediante PCR y su posterior análisis por RFLP (Polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción) Todos los procedimientos de genotipado se verifican mediante secuenciación Sanger del DNA.

## 7. TRATAMIENTO:

La principal consideración a tener en cuenta en perros con la mutación *MDR1* es la aplicación de medicamentos alternativos a los fármacos sustratos de la Gp-P.

Por ejemplo se puede sustituir la desparasitación con ivermectina (Ivomec), moxidectina (Advocate), selamectina (Stronghold) o milbemicina (Milbemax) por principios activos como fenbendazol (Panacur), fipronil (Frontline), prazicuantel, pirantel y febantel (Zypiran o Dolpac), imidacloprid (Advantix) o deltametrina (Scalibor).

Se debe tener muy en cuenta el uso de acepromacina como tranquilizante o incluso como anestesia para estos animales, ya que este medicamento es de uso cotidiano en la práctica veterinaria y se debe usar dosis más bajas que las normales y requiere intenso control del animal. Se podría sustituir la acepromacina por benzodiazepinas (diazepam, midazolam, zolazepam), medetomidina o dexmetomidina.

Tanto en perros con la mutación como en perros sin ella, hay que ajustar muy bien las dosis para evitar intoxicaciones.

Se ha realizado un estudio basado en el tratamiento mediante diálisis en perros con la mutación *MDR1* (Londoño *et al.*, 2017).

Este trabajo estudia el caso de dos perros de raza Pastor Australiano, portadores homocigotos de la mutación del gen *MDR1*, intoxicados con ivermectina, los cuales fueron tratados inicialmente con una emulsión lipídica intravenosa sin mejoría de signos clínicos. Ambos padecían parálisis respiratoria y requerían ventilación mecánica. Se llevó a cabo diálisis con SPLD (Single Pass Lipid Dialysis) al 5% de lípidos y se tomaron muestras sanguíneas inmediatamente antes y después de la diálisis. Se analizó la concentración de ivermectina en suero, siendo el ratio de reducción de ivermectina del 29% y 39% para los dos perros respectivamente. Cuando la ausencia de ivermectina en el cuerpo de los perros fué total, sólo el segundo individuo presentó una mejora relativa del aclaramiento plasmático tras SPLD. Ambos perros permanecieron con ventilación artificial varios días y finalmente se recuperaron completamente.

Por lo tanto, la diálisis de lípidos de paso único o SPLD (Single Pass Lipid Dialysis), puede ser una estrategia detoxificante adicional para las intoxicaciones lipídicas severas como la causada por la ivermectina en estos animales.

## **JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS:**

Como se ha indicado anteriormente, los problemas derivados de la mutación del gen *MDR1* son de gran importancia en la clínica veterinaria habitual, ya que los fármacos involucrados son de uso rutinario por profesionales veterinarios e incluso por los propietarios. Por ejemplo, la Ivermectina es uno de los principales componentes de la gran mayoría de antiparasitarios del mercado. El censo de ejemplares de las razas susceptibles conocidas hasta el momento es elevado en nuestro entorno. En el resto de las razas hay por el momento un notable déficit de estudios científicos, desconociéndose la existencia de mutaciones en este locus.

A través de un criador de perros Rottweiler se tuvo conocimiento del caso de una hembra de esta raza, de un año de edad que aparentemente sufrió una reacción adversa a la administración de un sedante en una clínica veterinaria, con objeto de realizar una serie de radiografías. De acuerdo al diagnóstico final, durante la referida actuación no se observó ningún síntoma inusual, pero en el momento de la recuperación se desarrolló un fallo multiorgánico que desembocó en la muerte del animal.

Aunque no ha sido posible acceder a muestras biológicas del referido ejemplar, su propietario conserva los dos progenitores del mismo. Además, es posible acceder a muestras de otros ejemplares con relación de parentesco con los anteriores. Al tratarse de una enfermedad hereditaria, el acceso a la pareja progenitora permitiría detectar la posible presencia de la mutación en el gen *MDR1* que el animal fallecido pudiera hipotéticamente haber heredado. El objetivo del estudio en laboratorio que se presenta en este Trabajo de Fin de Grado es precisamente comprobar esta circunstancia.

## **MATERIAL Y MÉTODOS**

### **1. METODOS DE BUSQUEDA DE BIBLIOGRAFIA:**

La búsqueda bibliográfica se ha realizado en gran medida mediante internet, a través de la base de datos de PubMed-NCBI y OMIA, a partir de las cuales se han buscado artículos relacionados con el tema a tratar.

También se ha hecho uso de libros de genética facilitados por la biblioteca de la Facultad de Veterinaria de Zaragoza.

Otra fuente de información se ha obtenido a partir de la página web del British Kennel Club, para el estudio de determinadas razas.



## 2. MÉTODOS DE LABORATORIO:

### 1.1. Material animal:

Como el individuo murió antes de realizar el estudio y no se conservaron muestras para poder extraer su DNA, se dispone de los progenitores, dos hermanos de camada (macho y hembra) y tres hermanos de la madre. En total se accedió a siete ejemplares de raza Rottweiler, pero sólo se aplicó el proceso de secuenciación parcial de *MDR1* en la pareja progenitora.

### 1.2. Toma de muestras:

Se procede al muestreo de los siete animales mediante la extracción de sangre periférica (concretamente de la vena cefálica). Una gota de cada ejemplar se transfiere a una tarjeta Guthrie, que permite la conservación de las muestras de sangre sin necesidad de refrigeración una vez seca, permitiendo que el proceso sea más sencillo. (McEwen y Reilly. 1994).

### 1.3. Extracción de DNA:

Se realiza la extracción de DNA con Chelex 100 según Gro *et al.* 2014. De forma resumida, se extrae con una aguja para biopsias un disco impregnado de sangre de 2mm de diámetro de cada tarjeta.

A continuación se lavan dos veces los discos obtenidos, en TE (tampón Tris/EDTA en concentraciones 10mM/1mM, pH=8).

Tras retirar el líquido de lavado se añade una solución de resina Chelex-100, (5% p/v en tampón TE, pH 8). Se incuba a 100°C durante 20 minutos. El líquido resultante se utiliza como fuente de DNA "crudo".

### 1.4. Diseño de cebadores PCR:

En la entrada NC\_006596.3 en GenBank, que corresponde al cromosoma 14 canino (Lindblad-Toh *et al.*, 2005), el gen *MDR1* ocupa las posiciones 13644891 a 13852843. Se diseñó una pareja de cebadores, para amplificar la zona del exón 25 en la que se incluye la posición de la mutación conocida, mediante la herramienta PrimerBLAST concretamente (Ye *et al.* 2012).

A dichos cebadores se añadieron los adaptadores M13 directo (-21) y M13 reverso (-29), para facilitar la posterior secuenciación de los productos de PCR, por lo que la secuencia final de ambos cebadores es:

**Forward 5'-TGT AAA ACG ACG GCC AGT TCCTCCCTTTTCCCCAGAA-3'**

**Reverse 5'-CAG GAA ACA GCT ATG ACC AGAGCAAATATCCATGAAACTGT-3'**

Donde los adaptadores mencionados se señalan con negritas.

Los productos de PCR esperados tienen un tamaño de 400 pares de bases.

### 1.5.Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR):

La reacción se optimizó a una concentración final de Magnesio de 2mM, y a temperatura de annealing de 58,4 °C. Para un volumen final de reacción de 25µl se utilizará:

	VOLUMEN (µl)
CEBADOR F (2mMol)	2.5 µl
CEBADOR R (2mMol)	2.5 µl
TAMPÓN (x10)	2.5 µl
MAGNESIO (Mg++) (50Mm)	1 µl
dNTP's (2,5 mM)	3.75 µl
Taq polimerasa (5u/µl)	0.15 µl
H2O	2.6 µl
<b>SUBTOTAL</b>	<b>15 µl</b>
<b>DNA</b>	<b>10 µl</b>
<b>TOTAL</b>	<b>25 µl</b>

### 1.6.Comprobación de la amplificación en gel de electroforesis de agarosa. Formación del gel:

Se comprobó la eficacia de la amplificación por PCR mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% (p/v en tampón TBE). La tinción del DNA se realiza mediante Gel Red (Biotium, Madrid), que permite observar los resultados con luz ultravioleta.

### 1.7.Secuenciación:

Se realiza secuenciación SANGER en los Servicios de Apoyo a la Investigación de la Universidad de Zaragoza (SAI).

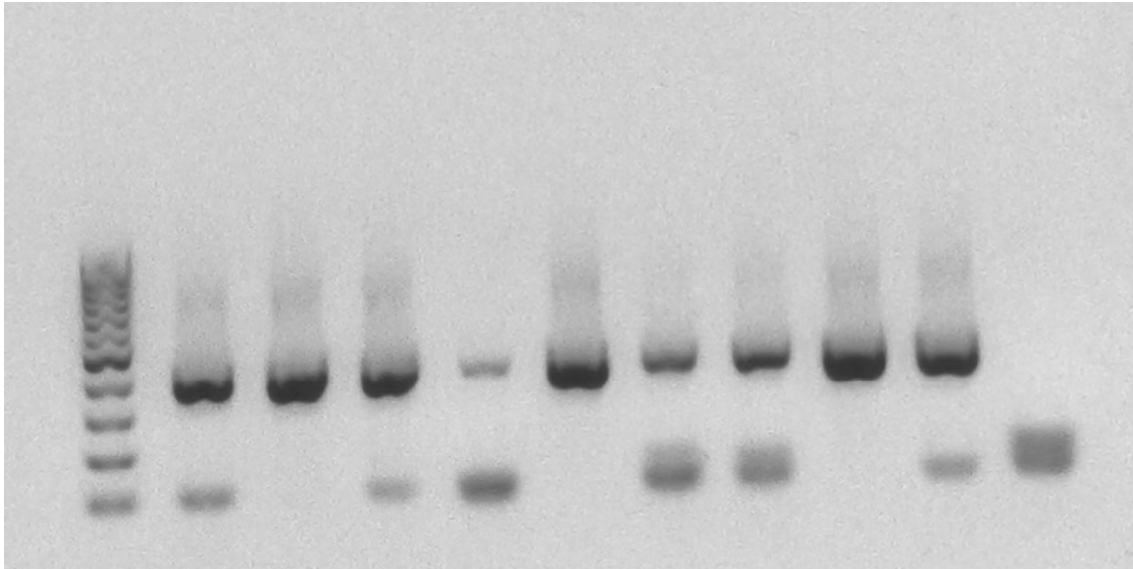
### 1.8.Alineación:

Las secuencias obtenidos se alinean con la secuencia de referencia mediante el software BioEdit, un completo editor de alineamiento de secuencias ácido/proteínas y análisis gratuito y fácil de usar (Hall, 1999).

## **RESULTADOS Y DISCUSIÓN:**

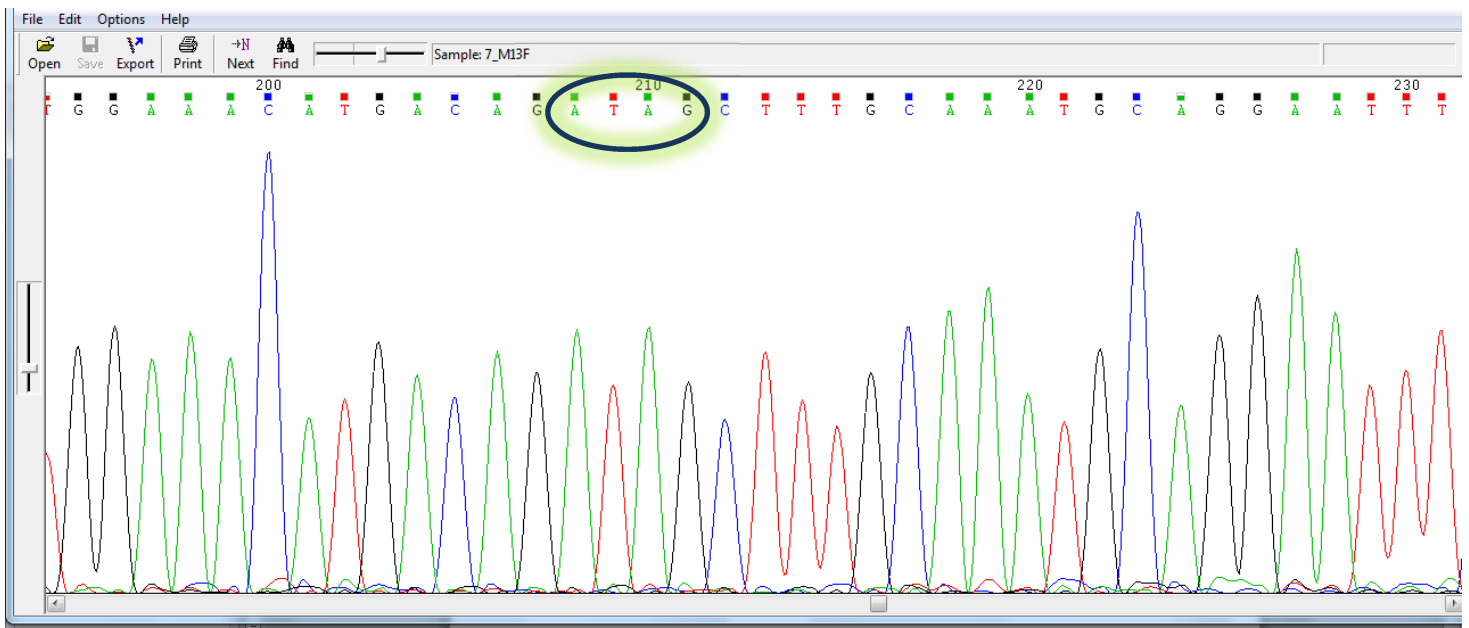
Como resultado de la amplificación se obtuvieron fragmentos de 400 pares de bases, tal y como se aprecia en la figura 4.

**Figura 4.** Imagen del gel de agarosa en la que se puede observar el marcador de peso molecular a la izquierda, las 9 muestras amplificadas produciendo una banda de 400pb y el control negativo a la derecha.



La secuenciación de los fragmentos proporcionó lecturas muy claras en la región correspondiente a la posición de la mutación conocida en el locus *MDR1*, tal y como se aprecia en la figura 5. Nótese en las posiciones 208 a 211 la inequívoca presencia en homocigosis de los nucleótidos A, T, A y G.

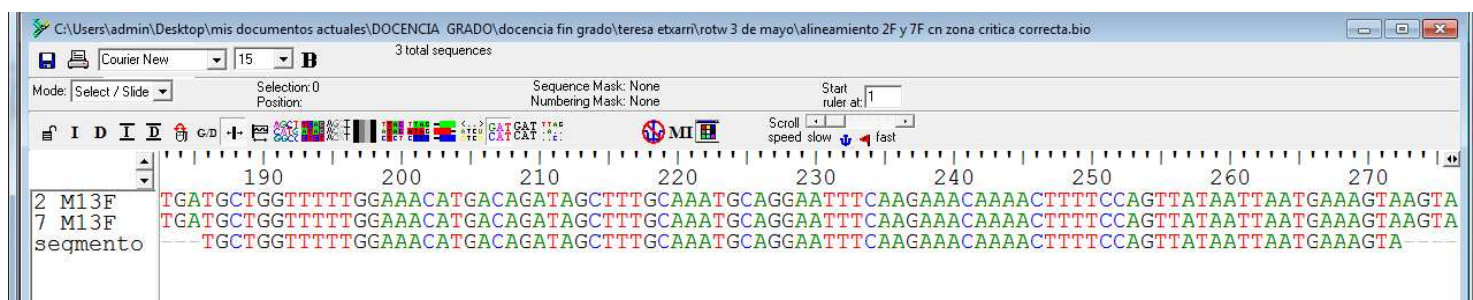
**Figura 5.** Imagen de la secuenciación en la que se observa homocigosis de los nucleótidos A, T, A y G.



El alineamiento resultante demuestra que los progenitores del animal afectado no son portadores de la delección nt230(del4), ya que no se observa ningún pico duplicado que señalara heterocigosis .

El alineamiento de la secuencia mediante el programa BioEdit, señala perfectamente el alineamiento de los dos progenitores con la secuencia salvaje de *MDR1* en esta zona.

**Figura 6.** Alineamiento de las secuencias de los dos progenitores y del segmento control. Nótese la total correspondencia de las secuencias.



Parece claro que en este episodio, los dos progenitores del animal que falleció por una reacción adversa, no son, en ningún caso, portadores de la delección nt230(del4). Esta observación es similar a la ocurrida en la raza Akita Inu (Firdova *et al.*, 2016) donde el análisis de los 38 perros tampoco resultó en la detección de nt230(del4).

No obstante, tal y como se ha descrito en apartados anteriores, el gen completo consta de 28 exones codificantes y se extiende a lo largo de más de 200.000 pares de bases. Ello implica un complejo “splicing”, que podría verse alterado incluso por modificaciones intrónicas afectando a la correcta síntesis del RNAm (Pierce, 2015), los dominios activos están a lo largo de toda la proteína resultante y por lo tanto no puede descartarse que en otras posiciones existan mutaciones de este gen todavía no descritas, que escapan a los objetivos de este Trabajo de Fin de Grado. *MDR1* sigue siendo un buen gen candidato en la búsqueda de la base hereditaria de reacciones adversas a medicamentos en perros.

## **CONCLUSIONES**

La mutación nt230(del4) descrita en el trabajo, que provoca la delección de cuatro pares de bases en el gen *MDR1*, es muy frecuente en determinadas razas y provoca fenómenos de reacciones adversas de carácter grave a medicamentos.

La prevalencia en determinadas razas es elevada. Por ejemplo, las frecuencias génicas y fenotípicas en poblaciones estudiadas de perros de raza Rough Collie y Smooth Collie son alarmantemente elevadas. Así mismo cabe destacar que no se adoptan medidas correctoras de selección en contra de la mutación. Por ejemplo, el British Kennel Club recomienda testar los perros de dichas razas, pero no lo exige como requisito en el reconocimiento de criadores asegurados. La implantación de restricciones de cría podría formar parte en el futuro de la selección en contra de la mutación, pero siempre teniendo en cuenta que la proporción actual de ejemplares portadores de la mutación es muy elevada.

La prudencia con la que se administran los medicamentos que son sustratos de la glicoproteína P debe ser extremada en los animales de las razas afectadas. El conocimiento de este problema por veterinarios y propietarios debería mejorarse notablemente, ya que un acto veterinario aparentemente rutinario puede ocasionar un grave accidente.

Así mismo, la severidad y la elevada prevalencia en algunas razas, junto con los numerosos fármacos implicados, contrasta con la relativa ignorancia que se observa al respecto en numerosos propietarios y veterinarios. Por ello sería necesario incluir una mayor formación al respecto en los estudios de graduación de veterinaria, así como una mayor información al respecto para los propietarios.

En el caso estudiado en este trabajo sobre una perra de raza Rottweiler, se comprueba que sus progenitores no son portadores de dicha delección. No obstante, sería necesario analizar más complejamente el gen *MDR1*, ya que hay muchos segmentos del mismo que no se han podido analizar en este Trabajo de Fin de Grado.

Para concluir, decir que la farmacogenética veterinaria es un área que se está desarrollando y que está logrando grandes avances, como es la determinación de la mutación de este gen, y que podrá ser de gran utilidad en futuros estudios y prácticas veterinarias.

## **CONCLUSIONS:**

Mutation nt230 (del4) already described in this research, which causes the deletion of four pairs of bases in the MDR1 gene, is very frequent in certain breeds and causes phenomena of adverse reactions to serious drugs. That is, adverse drug reactions related to MDR1 gene alterations are serious.

Prevalence in certain breeds is high. For example, gene and phenotypic frequencies in studied populations of Rough Collie and Smooth Collie dogs are alarmingly high. It is also worth noting that no corrective measures are taken against mutation, so the British Kennel Club recommends testing dogs of these breeds but it is not required as an integral requirement to be recognized as a breeder insured, and even in others races affected to a lesser extent it is not recommended. Breeding restrictions could be part of the future of selection against the mutation, but the present high proportion of individuals carrying the mutation must be taken into account.

The prudence in the use of drugs associated to Gp-P must be extreme in animals from the affected breeds. Veterinarians and owners should also be aware of this problem, since a routine veterinary act may result in a severe accident.

Likewise, the severity and high prevalence in some breeds, along with the numerous drugs involved, contrasts with the relative ignorance observed in this regard in many owners and veterinarians. That is why, I think it would be necessary to include more training in this regard in veterinary graduation studies, as well as more information on this for owners.

In the case studied in this research on the Rottweiler, it is verified that its progenitors do not carry this deletion, however, it would be necessary to analyse more in detail the den MDR1, since there are many possibilities that could not be contemplated in this Work of End of Grade, as well described in the section on results and discussions of the study.

To conclude, state that veterinary pharmacogenetics is an area that is developing and is making great strides, such as the determination of this gene mutation, and that may be of great use in future studies and veterinary practices.

## **VALORACIÓN PERSONAL:**

La elección de este proyecto como Trabajo de Fin de Grado responde al deseo personal de conocer la causa de este tipo de afecciones, así como las numerosas consecuencias que acarrea en la práctica veterinaria común y los diferentes ámbitos que se ven implicados. He comprendido la gravedad de las consecuencias de la mutación y la importancia de que se conozca.

Gracias al Departamento de Anatomía, Embriología y Genética Animal, he podido tomar contacto con la práctica y procedimientos de laboratorio, y combinando el trabajo de laboratorio con la revisión bibliográfica he experimentado las dos caras complementarias del campo de la investigación.

Por ello quería agradecer el apoyo y asesoramiento a todo el departamento, en especial a los tutores Luis Monteagudo y Teresa Tejedor, y a Ana Solana por su apoyo en laboratorio.

También he de decir que gracias a este trabajo he perfeccionado la búsqueda de información en bases de datos como PubMed, el uso de programas on-line de genética, así como la capacidad de redacción y de indicar las referencias bibliográficas.

## **BIBLIOGRAFÍA:**

Baars C., Leeb T., von Klopmann T., Tipold A., Potschka H. 2008. Allele-specific polymerase chain reaction diagnostic test for the functional MDR1 polymorphism in dogs. *Vet. J.* 177, 394-397.

British Kennel Club. 2017. Breeding Restrictions. Disponible en [www.thekennelclub.org.uk/](http://www.thekennelclub.org.uk/) (Último acceso el 12 de junio de 2017).

Campbell W.C. and Benz G.W. 1984. Ivermectin: a review of efficacy and safety. *J Vet Pharmacol Ther* 7, 1-16. Pubmed reference: 6368862.

Campbell, W.C., 1993. Ivermectin, an antiparasitic agent. *Med. Res. Rev.* 13, 61-79.

Chen C.-J., Chin J.E., Ueda K., Clark D.P., Pastan I., Gottesman M.M., et al. 1986. Internal duplication and homology with bacterial transport proteins in the *mdr1* (P-glycoprotein) gene from multidrug-resistance human cells. *Cell.* 47, 381-389.

Coelho J, Tucker R, Mattoon J, Roberts G, Waiting D, Mealey K. 2009. Biliary excretion of technetium-99m sestamibi in wild-type dogs and in dogs with intrinsic (*ABCB1* -1 $\Delta$  mutation) and extrinsic (ketoconazole treated) P-glycoprotein deficiency. *J. Vet. Pharmacol. Therap.* 32, 417-421.

De Silva N. 1997. Guyatt helminthics. A comparative review of their clinical pharmacology. *Drugs* 53, 769-788.

Fecht, S., Wohlke, A., Hamann, H., Distl, O., 2007. Analysis of the canine *mdr1*-1 $\Delta$  mutation in the dog breed Elo. *J. Vet. Med. A Physiol. Pathol. Clin. Med.* 54, 401-405.

Firdova Z., Turnova E., Bielikova M., Turna J., Dudas A. 2016. The prevalence of *ABCB1:c.227\_230delATAG* mutation in affected dog breeds from European countries. *Research in Veterinary Science.* 106, 89-92.

Fromm M. 2000. P-glycoprotein: A defense mechanism limiting oral bioavailability and CNS accumulation of drugs. *International Journal of Clinical Pharmacology and Therapeutics.* 38, 69-74.

Fromm M. 2003. Importance of P-Glycoprotein for drug disposition in humans. *European Journal of Clinical Investigation.* 33, 6-9.

Fromm M. 2004. Importance of P-glycoprotein at blood-tissue barriers. *TRENDS in Pharmacological Sciences.* 25 (8), 423-429.

Gerlach J.H., Endicott J.A., Jauranka P.F., Henderson G., Sarangi F., Deuchars K.L., et al. 1986. Homology between P-glycoprotein and a bacterial haemolysin transport protein suggests a model for multidrug resistance, *Nature.* 324, 486-489.

German U.A. 1996. P-glycoprotein-a mediator or multidrug resistance in tumour cells. *Eur J Cancer.* 32A(6), 927-44.



- Geyer J. and Janko C. 2012. Treatment of MDR1 mutant dogs with macrocyclic lactones. *Curr. Pharm. Biotechnol.* 13, 969-986.
- Geyer J., Doring B., Godoy J.R., Leidolf R., Moritz A., Petzinger E. 2005a. Frequency of the nt230(del4) MDR1 mutation in Collies and related dog breeds in Germany. *J. Vet. Pharmacol. Ther* 28, 545-551.
- Geyer J., Doring B., Godoy J.R., Moritz A., Petzinger E. 2005b. Development of a PCR-based diagnostic test detecting a nt230(del4) MDR1 mutation in dogs: Verification in a moxidectin-sensitive Australian shepherd. *J. Vet. Pharmacol. Therap.* 28, 95-99.
- Geyer J., Klintzsch S., Meerkamp K., Wöhlke A., Distl O., Moritz A., Petzinger E. 2007. Delection of the nt230 (del4) MDR1 mutation in White Swiss Shepherd dogs: case reports of doramectin toxixosis, breed predisposition, and microsatellite analysis. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics.* 30, 482-485.
- Gokbulut C., Karademir U., Boyacioglu M., McKellar Q. 2006. Comparative plasma dispositions of ivermectin and doramectin following subcutaneous and oral administration in dogs. *Veterinary Parasitology.* 135, 347-354.
- Gramer I., Leidolf R., Doring B., Klintzsch S., Kramer E.M., Yalcin E., Geyer J. 2011. Breer distribution of the nt230(del4) MDR1 mutation in dogs. *Vet. J.* 189, 67-71.
- Gro E.A., Strom, Marit G. Tellevik, Kurt Hanevik, Nina Langeland, Bjorn Blomberg. 2014. Comparison offour methods for extracting DNA from dried blood on filter paper for PCR targenting the mitochondrial *Plasmodium* genome. *Trans R Soc Trop Med Hyg;* 108, 488-494.
- Gros P., Croop J. and Housman D. 1986. Mammalian multidrug resistance gene: Complete cDNA sequence indicates strong homology to bacterial transport proteins. *Cell* 47, 371-380.
- Hall T.A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series N°41*, 95-98.
- Henik R., Kellum H., Bentjen S., Mealey K. 2006. Digoxin and mexiletine sensitivity in a collie with the MDR1 mutation. *J Vet Intern Med.* 20, 415-417.
- Heyden S., van der Ghevens E., Bruijn E. de, Oosterom A., van Maes R. 1995. P glycoprotein: clinical significance and methods of analysis. *Clin Rev Clin Lab Sci.* 32, 221-64.
- Higgins C.F. 1992. ABC transporters: from microorganisms to man. *Annual Reviews of Cell Biology.* 8, 67-113.
- Hugnet C, Cadore J, Buronfosse F, Pineau X, Mathet T, Berny P. 1996. Loperamide poisoning in the dog. *Vet Hum Toxicol.* 38, 31-33.
- Hugnet C., Bentjen S.A., Mealey K.L., 2004. Frequency of the mutant MDR1 allele associated with multidrug sensitivity in a sample of collies from France. *J. Vet. Pharmacol. Ther.* 27, 227-229.

Joob B. and Wiwanitkit V. 2016. ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP), member 1 (ABCB1) polymorphism and clopidogrel concentration in acute coronary syndrome: molecular change can explain the observed therapeutic concentration. *Anatol. J. Cardiol.* 16(4), 303-4.

Kawabata A., Momoi Y., Inoue-Murayama M., Iwasaki T., 2005. Canine *mdr1* gene mutation in Japan. *J. Vet. Med. Sci.* 67, 1103-1107.

Kitamura Y., Koto H., Matsuura S., Kawabata T., Tsuchiya H., Kusuha H. et al. 2008. Modest effect of impaired P-glycoprotein on the plasma concentration of fexofenadine, quinidine and loperamide following oral administration in collies. *Drug Metabolism and Disposition.* 36, 807-810.

Klitzsch S., Meerkamp K., Doring B., Geyer J., 2010. Detection of the nt230(del4) MDR1 mutation in dogs by a fluorogenic 5' nuclease TaqMan allelic discrimination method. *Vet. J.* 185, 272-277.

Kukekova A.V., Goldstein O., Johnson J.L., Richardson M.A., Pearce-Kelling S.E., Swaroop A., Friedman J.S., Aguirre G.D., Acland G.M. 2009. Canine *RD3* mutation establishes red-cone displasia type 2 (*rcd2*) as ortholog of human and murine *rd3*. *Mamm. Genome* 20, 109-123.

Lankas G., Wise L.D., Cartwright M., Pippert T., Umbenhauer D. 1998. Placental P-glycoprotein deficiency enhances susceptibility to chemically induced birth defects in mice. *Reproductive Toxicology.* 12(4), 457-463.

Lindblad-Toh K., Wade C.M., Mikkelsen T.S., Karlsson E.K., Jaffe D.B., Kamal M., Clamp M., Chang J.L., Kulbokas E.J. III, Zody M.C. et al. 2005. Genome sequence, comparative analysis and haplotype structure of the domestic dog. *Nature* 438, 803-819.

Londoño L.A., Buckley G.J., Bolfer L., Bandt C. 2017. Clearance of plasma ivermectin with single pass lipid dialysis in 2 dog. *Journal of Veterinary Emergency and Critical Care* 27, 232-237.

Lowe J.K., Kulekova A.V., Kirkness E.F., Langlois M.C., Aguirre G.D., Acland G.M., Ostrander E.A. 2003. Linkage mapping of the primary disease locus for collie eye anomaly. *Genomics* 82, 86-95.

Martinez M., Modric S., Sharkey M., Troutman L., Walker L., Mealey K. 2008. The pharmacogenomics of P-glycoprotein and its role in veterinary medicine. *J. Vet. Pharmacol. Therap.* 31, 285-300.

McEwen J.E. and Reilly P.R.. 1994. Stored Guthrie Cards as DNA "Banks". *Am.J.Hum.Genet.* 55, 196-200.

Mealey K. 2008. Canine ABCB1 and macrocyclic lactones: Heartworm prevention and pharmacogenetics. *Veterinary Parasitology.* 158, 215-222.

Mealey K., Fidel J., Gay J., Impellizzeri J., Clifford C., Bergman P. 2008a. ABCB1-1Δ polymorphism can predict hematology toxicity in dogs treated with vincristine. *J. Vet Intern Med.* 22, 996-1000.

Mealey K., Gay J., Martin L., Waiting D. 2007. Comparison of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in MDR1-1 $\Delta$  and MDR1wild-type dogs. *Journal of Veterinary Emergency and Critical Care*. 17, 61-66.

Mealey K., Greene S., Bagley R., Gay J., Tucker R., Gavin P. et al. 2008b. P-glycoprotein contributes to the blood-brain but not blood-cerebrospinal fluid barrier in a spontaneous canine P-glycoprotein knockout model. *Drug Metabolism and Disposition*. 36, 1073-1079.

Mealey K., Northrup N., Bentjen S. 2003. Increased toxicity of P-glycoprotein substrate chemotherapeutic agents in a dog with the MDR1 deletion mutation associated with ivermectin sensitivity. *J am Vet Med Asso*. 223, 1453-1455.

Mealey K.L. 2004. Therapeutic implications of the MDR-1 gene. *Jornal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics* 27, 257-264.

Mealey K.L. and Merus K.M. 2008. Breed distribution of the ABCB1 1-1 Delta (multidrug sensitivity) polymorphism among dogs undergoing ABCB1 genotyping. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 233, 921-924.

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

Mealey K.L., Munyard K.A., Bentjen S.A., 2005. Frequency of the mutant MDR1 allele associated with multidrug sensitivity in a sample of herding breeder dogs living in Australia. *Vet. Parasitol*. 131, 193-196.

Menez C., Mselli-Lakhal L., Foucaud-Vignault M., Balaguer P., Alvinerie M., Lespine A. 2012. Ivermectin induces P-glycoprotein expression and function through mRNA stabilization in murine hepatocyte cell line. *Biochemical Pharmacology*. 83, 269-278.

Mizukami K., Chang H.S., Yabuki A., Kawamichi T., Hossain M.A., Rahman M.M., Uddin M.M., Yamato O. 2012. Rapid genotyping assays for the 4-base pair deletion of canine MDR1/ABCB1 gene and low frequency of the mutant allele in Border collie dogs. *J. Vet. Diagn. Investig*. 24, 127-134.

Neff M.W., Robertson K.R., Wong A.K., Safra N., Broman K.W., Slatkin M., Mealey K.L., Pedersen N.C., 2004. Breed distribution and history of canine *mdr1*-1 $\Delta$ , a pharmacogenetics mutation that marks the emergence of breeds from the collie lineage. *Proc. Ntl. Acad. Sci. U.S.A.* 101, 11725-11730.

Nelson O.L., Carsten E., Bentjen S.A., Mealey K.L. 2003. Ivermectin toxicity in an Australian Shepherd dog with the MDR1 mutation associated with ivermectin sensitivity in Collies. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 17, 354-356.

Paul A.J., Tranquilli W.J., Seward R.L., Todd K.S., DiPietro J.A. 1987. Clinical observations in collies given ivermectin orally. *Am J Vet Res* 48, 684-5. Pubmed reference: 3592367.

- Pekcec A., Schneider E.L., Baumgartner W., Stein V.M., Tipold A., Postchka H. 2011. Age-dependent decline of blood-brain barrier P-glycoprotein expression in the canine brain. *Neurobiology of Aging*. 32, 1477-1485.
- Pierce B.A. 2015. *Genética. Un enfoque conceptual*. Editorial Médica Panamericana. Madrid.
- Roulet A., Puel O., Gesta S., Lepage J.F., Drag M., Soll M., Alvinerie M., Pineau T. 2003. MDR 1-deficient genotype in Collie dogs hypersensitive to the P-glycoprotein substrate ivermectin. *European Journal of Pharmacology* 460, 85-91.
- Sartor L., Bentjen S., Trepanier L., Mealey K. 2004. Loperamide toxicity in a collie with the MDR1 mutation associated with ivermectin sensitivity. *J. Vet Intern Med.* 18, 117-118.
- Schinkel A. 1999. P-Glycoprotein, a gatekeeper in the blood-brain barrier. *Advance Drug Delivery Reviews*. 36, 179-194.
- Schinkel A.H., Smit J.J., van Tellingen O., Beijnen J.H., Wagenaar E., van Deemter L., Mol C.A., van der Valk M.A., Robanus-Maandag E.C., Te Riele H.P. 1994. Disruption of the mouse *mdr1* a P-glycoprotein gene leads to a deficiency in the blood-brain barrier and to increased sensitivity to drugs. *Cell* 77, 491-502.
- Schinkel A.H., Wagenaar E., Mol C.A., Van Deemter L. 1996. P-glycoprotein in the blood-brain barrier of mice influences the brain penetration and pharmacological activity of many drugs. *J. Clin. Invest.* 97, 2517 – 2524.
- Schricks J. and Fink-Gremmels J. 2008. Implications of ABC transporters in the disposition of typical veterinary medicinal products. *European Journal of Pharmacology*. 582, 510-519.
- Sherman J. 2011. Understanding the impact of P-glycoprotein mutation on canine health. *The Veterinary Journal*. 190, 13-14.
- Thiebaut F., Tsuruo T., Hamada H., Gottesman M., Pastan I., Willingham M. 1987. Cellular localization of the multidrug-resistance gene product P-glycoprotein in normal human tissues. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 84, 7735-7738.
- Vail D. 2009. Supporting the veterinary cancer patient on chemotherapy: Neutropenia and gastrointestinal toxicity. *Top Companion Anim Med.* 24, 122-129.
- Ye J., Coulouris G., Zaretskaya I., Cutcutache I., Rozen S., Madden T.L. 2012. "Primer-BLAST: a tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction." *BMC Bioinformatics* 13, 134.
- Zhou S.F. 2008. Structure, function and regulation of P-glycoprotein and its clinical relevance in drug disposition. *Xenobiotica* 38. 802-832.
- Barbet J., Snook T., Gay J., Mealey K. 2008. ABCB1-1Δ (MDR1-1Δ) genotype is associated with adverse reaction in dogs treated with milbemycin oxime for generalized demodicosis. *Journal Compilation. ESVD and ACVD.* 20, 111-114.

Correa AR. and Castaño E. 2014. Evaluación de la mutación ABCB1-1Δ en perros y sus implicaciones terapéuticas y toxicológicas. Revista Biosalud. 13, 65-75.