

Determinación de la mutación nt230 (del4) MDR1/ABCB1 en la P-glicoproteína canina: Establecimiento de un protocolo apto y resultados preliminares en Costa Rica.



Campos-Calderón, Liliana¹; Luna-Tortós, Carlos¹

¹ Escuela de Medicina Veterinaria, Universidad Nacional. Heredia, Costa Rica.



Introducción.

La P-glicoproteína (Pgp o MDR1) es una proteína transmembrana que cumple un papel importante en el transporte de numerosos sustratos a través de barreras celulares. Está codificada por el gen ABCB1 y se expresa en tejidos como barrera hematoencefálica, placenta, ductos pancreáticos y células tubulares del riñón. La mutación nt230 (del4) MDR1/ABCB1 en este gen, consiste en la pérdida de cuatro pares de bases en el exón 4, lo que produce la formación de un codón de terminación que genera un producto de 91 aminoácidos en lugar de los 1280 que componen la proteína normal. Dada la importancia de la Pgp en la disposición parenquimal de fármacos, especialmente a nivel del sistema nervioso central, su alteración genera efectos en la distribución de diversos medicamentos como antiparasitarios, analgésicos y antineoplásicos; por lo que su detección es valiosa para establecer las dosis adecuadas en animales portadores de la mutación. Hasta el momento esta ha sido reportada con una frecuencia variable en al menos trece razas de caninos en diferentes países de Europa, así como en Estados Unidos, Australia, Japón e Israel. Sin embargo, dado que en el país ni en Centroamérica existen reportes en razas propensas a presentarla, se planteó el presente estudio con el fin de implementar un protocolo para su detección en perros de Costa Rica.

Metodología

Muestra sangre EDTA. n=24
17 collies, 5 pastores alemanes, 1 pastor australiano, 1 pastor malinois

Adaptación de extracción de ADN sanguíneo con TRIZOL™

PCR

Evaluación de dos juegos de iniciadores

Electroforesis

Gel de agarosa
Gel de poliacrilamida
Electroforesis capilar

Secuenciación

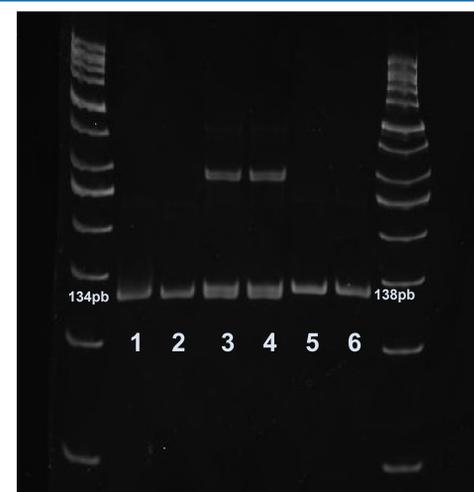


Resultados.

A partir de los diferentes protocolos y condiciones publicados se logró adaptar una metodología que disminuye la cantidad de reactivos utilizados, facilita la preparación de los geles, reduce el tiempo de corrida y reduce la generación de desechos tóxicos, con relación a los descritos en la literatura.

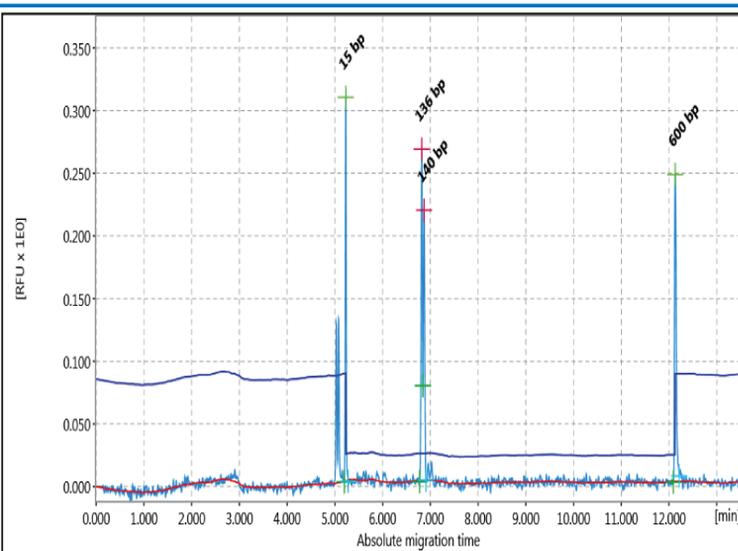
La secuenciación de los productos obtenidos mostró una homología del 100% con secuencias de p-glicoproteína de perro. La mutación fue detectada en caninos de raza collie y pastor australiano.

Genotipo	n	Frecuencia (%)
Homocigota dominante	13	54
Heterocigoto	10	42
Homocigota recesivo	1	4
Total	24	100



Distribución de frecuencias genotípicas de la mutación nt230(del4) MDR1 en los perros estudiados

Electroforesis en gel de poliacrilamida con cada uno de los genotipos en duplicado: Homocigota recesivo (1 y 2), heterocigota (3 y 4) y homocigota dominante (5 y 6).



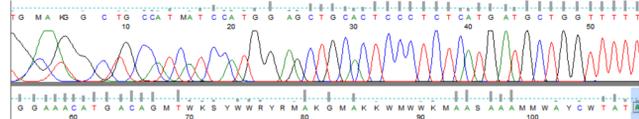
Electroforesis capilar de un control heterocigota

BLAST

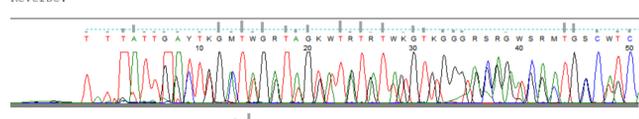
>NM_001003215.2 Canis lupus familiaris ATP binding cassette subfamily B member 1 (ABCB1), mRNA
GGCTGCCATCATCCATGGAGCTGCACTCCCTCTCATGATGCTGGTTTTGGAAACATGACAGATAGCTTTGCCAAATGCAG
GAATTTCAAGAAACAAACTT

GGCTGCCATCATCCATGGAGCTGCACTCCCTCTCATGATGCTGGTTTTGGAAACATGACAGATAGCTTTGCCAAATGCAGAAACAA
GGCTGCCATCATCCATGGAGCTGCACTCCCTCTCATGATGCTGGTTTTGGAAACATGACAGATAGCTTTGCCAAATGCAGAAATTCAGAAACAA

Forward:



Reverse:



Electroferograma de secuenciación de una muestra heterocigota.

Conclusiones.

1. Fue posible adaptar y optimizar un protocolo para detectar la mutación nt230 (del4) MDR1/ABCB1, según nuestras condiciones de laboratorio.

2. El presente trabajo constituye el primer reporte para Costa Rica de la presencia de dicha mutación en el gen de la P-glicoproteína en caninos domésticos.

Agradecimientos.

Al Dr. Anderson Machado por colaborar en la obtención de una muestra control.
Al Dr. José Pablo Solano y a los estudiantes Roberto Leiva y Édgar Alfaro por su colaboración en la obtención de las muestras analizadas.

A la Ing. Nazareth Ruiz del laboratorio de Bioquímica por su ayuda en el análisis de electroforesis capilar.

A la división de Genética Molecular del Laboratorio Nacional de Tamizaje Neonatal y Alto riesgo del Hospital Nacional de Niños por su colaboración en la secuenciación de las muestras.

Referencias.

- Dekel Y. et al. *BMC Vet Res* 2017, 13: 333.
Geyer J. et al. *J VET Pharmacol Therap.* 2005, 28: 95-99.
Gramer I. et al. *The Veterinary Journal* 2011, 189: 67-71.
Mealey K. et al. *Pharmacogenetics* 2001, 11(8): 727-33.

Contacto.

Cátedra de Farmacología y Toxicología. Tel. +506-2562-4526
Liliana Campos Calderón: lilianac@yahoo.com
Carlos Luna Tortós: carlos.luna.tortos@una.cr