

## ESTUDIO MOLECULAR DEL GEN *CYP2D15* (CITOCROMO P450 2D15) EN EL PERRO CIMARRÓN URUGUAYO

### MOLECULAR STUDY OF GENE *CYP2D15* (CYTOCHROME P450 2D15) IN CIMARRON URUGUAYO DOG

El gen *CYP2D15* en el perro Cimarrón

Rosa Gagliardi<sup>1\*</sup>, Silvia Llambi<sup>1</sup>, María Victoria Arruga<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Área Genética, Facultad de Veterinaria, UdelaR. Montevideo, Uruguay. \*rgagliar@gmail.com

<sup>2</sup>Laboratorio de Citogenética y Genética Molecular, Facultad de Veterinaria, UniZar, Zaragoza, España

#### Abstract

The Uruguayan Cimarron dog is the only canine breed native from Uruguay; it was finally recognized as a breed in early 2011 by the “Fédération Cynologique Internationale”. This has meant an increased interest in the breed by breeders, exhibitors and pet owners in general. This interest has led to a significant increase in the number of animals registered in the genealogical records of the race, from nine hundred and thirty animals in October 1997, to more than 6,000 today. Moreover, these factors have led to different analysis are performed in order to continue with the knowledge of the genetics of this breed. Among the studies currently underway are those related to pharmacogenetics. *CYP2D15* is one of the genes that are more involved in the metabolism of many widely used drugs in veterinary medicine, being described different polymorphisms for it. With primers: forward: TCTCTCCCTCTGCCCCAGAG; reverse: CCCAGGCTGTCCATCCTCTC, different polymorphisms were detected for exon 7 of this gene in other breeds. There is no information about the breed Cimarron Uruguayo. In this paper we analyze the polymorphisms for exon 7 of the gene *CYP2D15* in 10 Cimarron dogs, using primers listed above, with conventional PCR and automated sequencing. In two of the animals tested it was found a point mutation in the nucleotide 81 of the sample. However, a high sequence homology with the sequence published in GenBank was observed.

#### Palabras clave:

Canino  
Farmacogenética

#### Keywords:

Canino  
Pharmacogenetics

#### Resumen

El perro Cimarrón Uruguayo es la única raza canina autóctona de Uruguay, siendo reconocida definitivamente como tal a principios de 2011 por la Federación Cinológica Internacional. Esto llevó a que criadores, expositores y propietarios de mascotas en general tengan un mayor interés en la raza. Este interés ha llevado a un aumento considerable en la cantidad de animales inscriptos en los registros genealógicos de la raza, pasando de novecientos treinta animales en octubre de 1997, a más de 6000 en la actualidad. Por otra parte, estos factores han conducido a que se realicen diversos análisis con el objetivo de continuar con el conocimiento de la genética de esta raza. Entre los estudios que se están realizando actualmente se encuentran los relacionados a la farmacogenética. El *CYP2D15* es uno de los genes que se encuentra más involucrado en el metabolismo de gran número de fármacos ampliamente usados en medicina veterinaria, describiéndose para el mismo diversos polimorfismos.

Con los cebadores: forward: TCTCTCCCTCTGCCCCAGAG; reverse: CCCAGGCTGTCCATCCTCTC, se han detectado diferentes polimorfismos para el exón 7 de este gen en otras razas caninas no existiendo antecedentes en la raza Cimarrón Uruguayo. En este trabajo se analizan los polimorfismos para el exón 7 del gen *CYP2D15* en 10 perros cimarrones, empleando los cebadores mencionados, mediante la utilización de la técnica de PCR convencional y secuenciación automatizada. En dos de los animales analizados se encontró una mutación puntual a la altura de la base 81 de la muestra analizada, existiendo una alta homología de la secuencia con la secuencia publicada en GenBank.

## Introducción

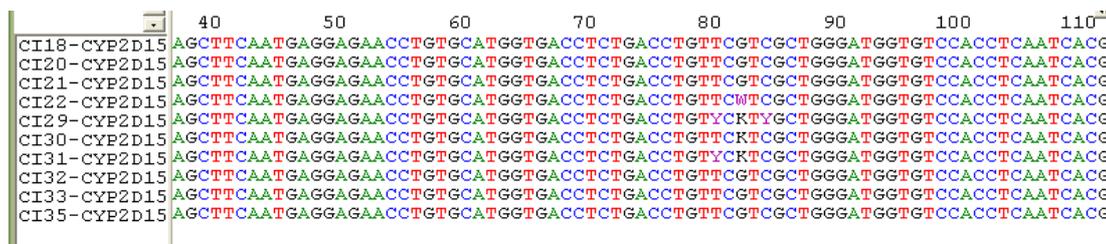
El perro Cimarrón Uruguayo es la única raza canina autóctona de Uruguay, siendo reconocida definitivamente como tal a principios de 2011 por la Federación Cinológica Internacional. Esto llevó a que criadores, expositores y propietarios de mascotas en general tengan un mayor interés en la raza. Este interés ha llevado a un aumento considerable en la cantidad de animales inscriptos en los registros genealógicos de la raza, pasando de novecientos treinta animales en octubre de 1997, a más de 6000 en la actualidad (<http://www.kcu.com.uy>). Por otra parte, estos factores han conducido a que se realicen diversos análisis con el objetivo de continuar con el conocimiento de la genética de esta raza. En los últimos años, la farmacogenética ha tenido un gran desarrollo, principalmente en humanos. En caninos, diversos autores han realizado estudios asociados a esta rama de la genética, basados en la importancia que tiene esta especie como modelo de lo que sucede en humanos, así como también considerando la importancia que presentan como pacientes veterinarios (Katz, D. A. & Bathena, A., 2009). En nuestro laboratorio, en los perros cimarrones se están estudiando genes asociados a la farmacogenética. Por un lado, ya se ha estudiado el gen *MDRI*, responsable de la sensibilidad que presentan diferentes razas caninas al antiparasitario ivermectina (Gagliardi R., 2009). Por otro lado, se están estudiando genes pertenecientes a la familia del citocromo P450 (*CYP450*). Dentro de esta familia, el gen *CYP2D15*, codifica para una proteína responsable del metabolismo de diferentes fármacos ampliamente usados en la clínica veterinaria (propranolol, dextrometorfano e imipramina) (Trepanier, L. A., 2006). Para el exón 7 de este gen, se han descrito diferentes mutaciones en diversas razas caninas (Rodríguez M. C., 2011). En la raza Cimarrón Uruguayo no hay estudios previos para este gen. El fin del presente trabajo es analizar el exón 7 del gen *CYP2D15* en esta raza.

## Material y métodos

Se realizó la extracción de ADN a partir de diez muestras sanguíneas de caninos de raza Cimarrón Uruguayo mediante la técnica de fenol-cloroformo. Se amplificó la secuencia correspondiente al exón 7 del gen *CYP2D15* por PCR empleando los cebadores *forward*: TCTCTCCCTCTGCCCCAGAG; *reverse*: CCCAGGCTGTCCATCCTCTC. Los productos amplificados fueron secuenciados (secuencia automática: Capillary electrophoresis, 3730 XL). Se realizó el alineamiento de las muestras analizadas con el programa BioEdit (<http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit/bioedit.html>), y se compararon con la secuencia publicada en el GenBank correspondiente a la raza canina Beagle (número de acceso GenBank: AB004268.1) con el programa Blast (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

## Resultados y discusión

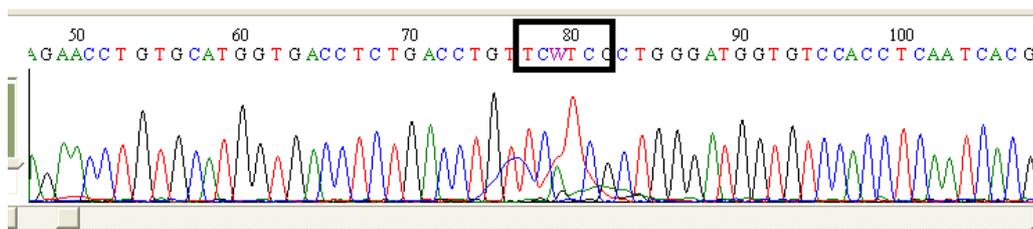
En las secuencias analizadas se encontró una alta homología con la secuencia publicada del gen *CYP2D15*, exón 7, (homología del 99 %) así como una alta homología al ser alineadas las diez secuencias entre sí (fig. 1). En las muestras de dos animales (CI29 y CI31) se identificó un polimorfismo de nucleótido simple (SNP) a la altura de la base 81 de la secuencia analizada, identificada con una “Y” (timina o citosina en las muestras secuenciadas, timina en la secuencia publicada) (fig. 1). También se encontraron SNPs en la muestra CI29 a la altura de la base 85 (fig. 1). A la altura de la base 83 también se encontró variación en distintas muestras; sin embargo, en este caso, la secuenciación no es del todo confiable (fig. 2), por lo que para considerar que existe realmente un SNP habría que repetir la secuenciación del ADN de ese animal.



**Figura 1.** Alineamiento entre las diez muestras analizadas (programa BioEdit) [Alignment among the ten analyzed samples (BioEdit program)]

La elevada homología existente entre las muestras secuenciadas y la secuencia publicada se explica por el hecho de que la región que se está estudiando es un exón, regiones altamente conservadas. Esto también explicaría la

homología que se presenta entre las diferentes muestras analizadas. Por otra parte, reviste un gran interés la existencia de SNPs en las muestras analizadas, ya que no fueron descritos previamente. Esto puede deberse a que los estudios existentes se realizaron en gran número de razas pero con un número muy limitado de animales por raza (Rodríguez M. C., 2011).



**Figura 2.** Cromatograma de la muestra CI22. El recuadro muestra la región de la secuencia donde no resulta confiable considerar variación (*Chromatogram of the CI22 sample. The inset shows the region of the sequence where it is not considered reliable variation*)

### Conclusiones

Para el exón 7 del gen *CYP2D15* se encontró una alta homología con la secuencia publicada.

Entre las diez muestras estudiadas existe un alto grado de conservación de la secuencia. Sin embargo, ya con este número de muestras se encontró variación (timina en lugar de citosina).

Dados los hallazgos de este trabajo, es de interés aumentar el número de muestras analizadas con el objetivo de continuar analizando la existencia de SNPs.

### Agradecimientos y financiación

Los autores agradecen a la Sra. Iris Hernández y a la Br. Kateryn Bentancor por su colaboración en la realización de técnicas de laboratorio.

Este trabajo es financiado por PEDECIBA, Universidad de la República, Uruguay y por alcúotas de Dedicación Total otorgadas por la Universidad de la República, Uruguay.

### Bibliografía

- Gagliardi R. Estudios genéticos en caninos de raza Cimarrón Uruguayo. Tesis de Maestría, PEDECIBA, UdelaR. 2009
- Katz D. A., Bhatena A. Overview of Pharmacogenetics. *Current Protocols in Human Genetics*, 2009, 9.19.1-9.19.23.
- Rodríguez, M. C. Caracterização do gene *cyp2d15* em canídeos domésticos e selvagens. Tesis de postgrado, Universidade Federal do Paraná. 2011
- Trepanier L. A. Cytochrome P450 and its role in Veterinary drug interactions. *Veterinary Clinics of North America. Small Animal Practice*, 2006, 36: 975-985
- <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>
- <http://www.kcu.com.uy>
- <http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit/bioedit.html>