

## Estudio de los procesos de evolución en tres genes de la especie canina (*MDR-1*, *CYP1A2* y *CYP2B11*) implicados en la resistencia a determinados fármacos

R. Gagliardi<sup>1</sup>, S. Munilla<sup>2</sup>, M.V. Arruga<sup>3</sup>, C. García<sup>3</sup>, S. Llambí<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Área de Genética. Facultad de Veterinaria, Universidad de La República,  
Montevideo, C.P. 11600, Uruguay

<sup>2</sup>Departamento de Producción Animal, Facultad de Agronomía,  
Universidad de Buenos Aires, Av. San Martín 4453 - C1417DSE - Buenos Aires, Argentina.

<sup>3</sup>Laboratorio de Citogenética y Genética Molecular. Facultad de Veterinaria.  
Universidad de Zaragoza. Miguel Servet, 177 Zaragoza, C. P. 50013, España.

### Abstract

The application of Pharmacogenetic and Pharmacogenomic knowledge is very important in clinical practice for adverse reaction prevention to drugs. It has been shown that not all drugs can be administered to all individuals, due to adverse reactions of intolerance controlled by genes. In many animal species, such as the canine species (*Canis lupus familiaris*), the *MDR-1*, *CYP1A2* and *CYP2B11* genes are associated with resistance to certain treatments, especially those used in clinical practice, such as antiparasitics, anesthetics and other treatments. Sometimes a treatment generates resistance after continuous exposure to the drug, whereby resistance phenotypes are selected, which is called MDR (Multidrug Resistance). The *CYP1A2* and *CYP2B11* genes are involved in the synthesis of proteins involved in the metabolism of numerous drugs, too. In the present work 26 SNP genetic markers linked to these genes are analysed. We wish to determine if any of them have suffered genetic selection or selective pressure over time, in four different canine breeds: Uruguayan Cimarrón, Border Collie, Labrador Retriever and German Shepherd. To test the hypothesis of neutral evolution we calculate the D statistic of Tajima. The results obtained indicate the neutrality hypothesis for the *MDR-1* and *CYP2B11* genes and it can be rejected for the *CYP1A2* gene.

## Introducción

Existe una creciente evidencia de un vínculo claro entre las características genotípicas de cada individuo y las reacciones adversas a los medicamentos.

Los campos de la Farmacogenética y Farmacogenómica son cada vez más prometedores con respecto a la aplicación clínica de la información genética para ayudar a prevenir reacciones adversas, poder predecir el comportamiento de los fármacos y descubrir nuevas dianas farmacológicas. Un enfoque de farmacogenética para reacciones a fármacos puede aconsejar una terapia para cada paciente y permitir un régimen de medicación individualizada (Ros *et al.*, 2010).

En la especie canina (*Canis lupus familiaris*), uno de los genes implicados en la respuesta a fármacos, en concreto a la resistencia a múltiples fármacos, es el gen *MDR*. Se ha identificado una mutación consistente en una delección de pares de bases de su secuencia, denominada *MDR1-1Δ* que en los individuos portadores y de forma más intensa en los individuos homocigóticos para la delección, provoca intolerancias con efectos graves, incluso la muerte, ante determinados fármacos de uso común, como acepromacina (tranquilizante y anestésico), butorfanol (analgésico y anestésico), emodepside (antihelmíntico), eritromicina, ivermectina (agente antiparasitario), loperamida (antidiarreico), selamectina, milbemicina y moxidectina (agentes antiparasitarios), vinblastina y doxorubicina (agentes de la quimioterapia), ciclosporina (inmunosupresor), digoxina (medicamento cardíaco), doxiciclina (droga antibacteriana), entre otros. Los perros con la mutación *MDR-1* son más sensibles a estos fármacos con respecto a su probabilidad de tener una reacción adversa al medicamento.

Estas reacciones han sido descritas, principalmente en la raza Collie y en otras razas próximas. En 2011, 2013 y 2015, Gagliardi *et al.*, estudiaron los genes *MDR-1* y *CYP2D15* en la raza de perro Cimarrón uruguayo no identificando la mutación, ni tampoco ningún efecto nocivo, en concreto a la ivermectina.

Usando la tecnología actual, como la secuenciación masiva del ADN, la identificación genética de alto rendimiento y la bioinformática, se pueden identificar las variables entre pacientes para predecir las diferencias en el comportamiento y la respuesta a los fármacos.

Se ha descrito que aproximadamente un 75 % de los Border Collie en EE.UU., Francia y Australia tienen el alelo mutante y otras razas afectadas son tienen un linaje común con la anterior (Tomiyasu *et al.*, 2014).

Los genes *CYP1A2* y *CYP2B11* codifican para enzimas de su mismo nombre y son miembros del grupo que controla la síntesis del citocromo P450. Esta clase de enzimas son responsables del metabolismo de una gran variedad de fármacos. (Kamimura, 2006; Barreiro *et al.*, 2008).

Se pueden utilizar marcadores genéticos, como los polimorfismos de una única base

(SNP), que son fáciles y rápidos de identificar mediante reacciones de PCR y secuenciación de los fragmentos amplificados, y que estén ligados a los genes implicados en el metabolismo de fármacos. De esta forma, con un sencillo examen previo de los genotipos de cada individuo se puede saber si presentan un genotipo positivo a la resistencia o no.

En este trabajo, los tres genes (*MDR-1*, *CYP2B11* y *CYP1A2*) que participan en el metabolismo de fármacos se estudiaron con el objetivo de identificar los polimorfismos que se presentan en 26 SNPs ligados, en 106 animales pertenecientes a cuatro razas caninas diferentes.

Es muy útil, en este sentido, analizar marcadores genéticos ligados a estos genes de interés, para determinar si alguno de ellos ha sufrido selección genética o presión selectiva a lo largo del tiempo. Es decir, si han sufrido selección unos genotipos se habrán ido eliminando, mientras que otros se habrán mantenido o aumentado en la población. Pero también pueden ser tan sólo variaciones genéticas presentes en la población y debidas a una evolución neutra. (Akey, 2009; Abecasis *et al.*, 2012; Subramanian, 2016). Por lo que es preciso probar, previamente, que la presencia de esa variabilidad genética es debida o no a una evolución neutra. Y uno de los mejores métodos existentes es la utilización de la metodología de estimación del estadístico D de Tajima (Tajima, 1989).

La llamada Genética de poblaciones proporcionó información sobre la naturaleza de la variación a nivel molecular y, como resultado, la evidencia de que existe una variación genética contenida en las proteínas y en los genes, que no puede ser totalmente explicada por los efectos de la selección natural. Estas ideas culminaron en la propuesta de la teoría neutra de la evolución.

Una importante revisión se propuso (Kimura, 1968, 1983) para introducir la teoría de la evolución neutra, que considera la evolución de las mutaciones deletéreas ligeramente beneficiosas, cuasi-neutrales, dependiendo principalmente de la tasa de mutación, los coeficientes de selección y del tamaño de la población.

Un grupo importante de las pruebas de neutralidad se deriva de la distribución de frecuencias de los alelos en los lugares determinados, el denominado espectro de frecuencias. Todas estas pruebas estadísticas se calculan como la diferencia estandarizada de dos estimadores imparciales de la tasa de mutación ( $\theta$ ) bajo el modelo neutral. Una de las pruebas de neutralidad mejor conocidas dentro de este grupo se basa en el estadístico D de Tajima (Tajima, 1989).

Esta prueba sirve como una prueba de neutralidad clásica que compara las estimaciones de la cantidad de separación de los sitios segregantes y de la diferencia media de pares de bases entre secuencias de ADN y el método  $F_{ST}$  basado en la diferenciación genética de la población. El estadístico D de Tajima se calcula como la diferencia estandarizada entre la estimación de  $\theta$ , basado en el número medio de diferencias por pares de bases y en el número de sitios segregantes (Barrett y Hoekstra, 2011).

El valor esperado de los estimadores bajo el modelo de evolución neutral es cero. Sin embargo, sí se detectan desviaciones significativas de cero, indica la no neutralidad. Más específicamente, los valores negativos de  $D$  pueden indicar selección positiva (o, posiblemente, una reducción en el tamaño de la población), mientras que los valores positivos indican selección equilibrada. (Van Straalen y Roelofs, 2012; Arenas et al., 2017).

Se aplicó esta prueba con el fin de determinar si la frecuencia observada de los 26 marcadores genéticos SNPs en los tres genes indicados, es consistente con un evento de selección reciente, o se corresponde con una variación genética dentro de la evolución neutra, en estas poblaciones caninas en concreto. Los resultados indican la importancia de la identificación genética de estos genes de forma previa a cualquier tratamiento clínico que se vaya a realizar en la población canina, para evitar muertes y reacciones adversas a los tratamientos y también colaboran a una mejor comprensión del proceso biológico de la selección natural, como principal motor del cambio evolutivo y fuente de adaptaciones fenotípicas.

## Material y métodos

Se estudiaron 106 animales pertenecientes a cuatro razas caninas (25 animales de la raza Cimarrón uruguayo, 23 de Border Collie, 29 de Labrador Retriever y 29 de Pastor Alemán), analizándose 26 marcadores genéticos SNPs pertenecientes a los genes *MDR-1*, *CYP1A2* y *CYP2B11*. De los cuales 5 (SNP1 a SNP5) pertenecientes al gen *MDR-1* (cromosoma 14; número de acceso GenBank NC\_006596.3; ID: 403879), 20 (SNP6 a SNP25) al gen *CYP1A2* (cromosoma 30; GenBank número de acceso NC\_006612.3 y ID: 494010) y uno (SNP26) al gen *CYP2B11* (cromosoma 1; número de acceso GenBank NC\_006583.3; ID : 474177).

El ADN se obtuvo de las muestras de sangre de cada animal, a partir del cual se analizaron los 26 SNP, obteniéndose los genotipos de cada individuo para esos 26 marcadores. A partir de los datos de genotipos se caracterizó genéticamente cada una de las cuatro poblaciones caninas estudiadas mediante los sistemas GENETIX (Belkhir *et al.*, 1996) y ARLEQUIN (Excoffier *et al.*, 2005).

### *Análisis estadístico*

Se ha estudiado el número de alelos por locus ( $A$ ), el número efectivo de alelos por locus ( $A_e$ ), el porcentaje de loci polimórficos ( $P$ ), la heterocigosidad observada ( $H_o$ ), la heterozigosidad esperada ( $H_e$ ) (Hartl y Clark, 1997; Hedrick, 2000). La diversidad genética total ( $H_T$ ), la diversidad genética dentro de las subpoblaciones ( $H_S$ ), la diversidad genética entre poblaciones (DST) y el coeficiente de diferenciación genética (GST) o diversidad genética dentro y entre las poblaciones locales (Hedrick, 2000).

Acerca de los estadísticos  $F$  de Wright, se calculó el coeficiente de endogamia entre individuos dentro de una población (FIS), el coeficiente de endogamia entre individuos en relación con la población total (FIT), así como la diferenciación genética entre poblaciones (FST).

Para evaluar si  $F$ , FIS y FIT eran significativamente diferentes de cero, se realizó una prueba  $\chi_2 = 2NF(k - 1)$  con  $df = k(k - 1)/2$ , donde  $F$  es el coeficiente de endogamia,  $N$  es el tamaño de la muestra y  $k$  es el número de alelos (Li y Horvitz, 1953).

Para determinar si los valores de FST eran significativamente diferentes de la prueba cero, se utilizó  $\chi_2 = 2NFST(k - 1)$  con  $df = (k - 1)(s - 1)$ , donde  $N$  es el tamaño de la muestra,  $k$  es el número de alelos y  $s$  es el número de subpoblaciones, en este caso el número de razas (Workman y Niswander, 1970).

Se calculó el flujo génico (Slatkin, 1987) ( $N_m$ ) y las distancias genéticas (Nei, 1978).

Las secuencias se alinearon utilizando el programa BioEdit (Hall, 1999). Las secuencias resultantes se analizaron utilizando el programa Blast (Altschul et al., 1997) para confrontar con las secuencias más similares en GenBank. La alineación de secuencias se realizó utilizando el programa CLUSTALW.

Se analizaron dos secuencias en cada animal. En algunas posiciones algunos de los alelos SNP fueron indeterminados, en tales casos, se realizó el criterio de eliminación de la secuencia completa de los polimorfismos individuales en este gen.

Para estudiar la hipótesis de neutralidad se calculó la prueba  $D$  de Tajima (1989). Los valores obtenidos se compararon con los límites de confianza publicados en dicho trabajo.

## Resultados

Entre los 26 SNPs estudiados pertenecientes a tres genes, cuatro de ellos, SNP1, SNP3, SNP4 y SNP5, presentaron fijación alélica en las razas Cimarrón Uruguayo y Labrador Retriever. La población Cimarrón Uruguayo presentó 10 loci homocigóticos.

### *Variación genética dentro de las poblaciones*

Se identificaron un total de 54 alelos en los 26 loci. El número medio de alelos por locus ( $A$ ), en el total de las cuatro poblaciones, fue de 2,08, con un rango de 2 a 4.

El porcentaje de loci polimórficos fue del 69,23 (95 % P), la heterocigosidad media observada  $H_o = 0,3948$  y la heterocigosidad esperada  $H_e = 0,3187$ , indican que se observó una mayor heterocigosidad de lo esperado, es decir un exceso de heterocigotos, en todas las razas, lo que significa una excelente variabilidad genética.

### *La diversidad genética dentro y entre las poblaciones*

La población Cimarrón Uruguayo presentó la diversidad genética más baja dentro de las poblaciones ( $H_e = 0,2455$ ), aunque otras poblaciones tienen una heterocigosidad bastante cercana a esos valores, concretamente  $H_e = 0,3175$  para la población Border Collie,  $0,2909$  para la población de Labrador Retriever y  $0,2674$  para la raza Pastor Alemán. La diversidad genética total ( $H_T$ ) fue moderada, la media es igual a  $0,3215$ , con un intervalo desde  $0,0504$  en el locus SNP2 a  $0,4997$  en el locus SNP14. La diversidad genética dentro de las poblaciones fue  $H_S = 0,2803$ .

El coeficiente de diferenciación genética obtenido ( $GST = 0,1280$ ) indica una diversidad genética del  $12,8\%$  entre las razas y de  $87,2\%$  dentro de las razas.

### *Estadísticos F de Wright*

Un exceso de homocigotos se identificó en tres loci (SNP6, SNP8 y SNP13), ya que FIS fue positivo con valores significativamente diferentes de cero (Tabla 1). Los restantes valores positivos de FIS, en 4 loci (SNP1, SNP3, SNP4 y el SNP22), no fueron significativamente diferentes de cero, lo que indica que están en equilibrio de Hardy-Weinberg.

Cuando se consideran los valores de FIS que han resultado significativamente diferentes de cero, éstos se obtuvieron en 16 loci, lo que indica que sólo 10 loci están en equilibrio de Hardy-Weinberg (Tabla 1).

El valor medio de FIS es de  $-0,39331$  y significativamente diferente de cero, indicando que no hay consanguinidad entre individuos dentro de cada población. El FIT medio es de  $-0,18922$ , indicando que la diferenciación de las poblaciones locales con respecto a la población total no es debido a la endogamia. El valor medio de FST fue  $0,14648$ , que prueba una moderada diferenciación genética entre las poblaciones analizadas (Tabla 1). Este valor coincide con la tasa de GST, lo que sugiere que la mayoría de la diversidad genética se encuentra dentro de las poblaciones y no entre poblaciones.

El valor medio del flujo de genes entre las poblaciones fue de  $5.867$ . Un valor  $N_m > 1$  indica un alto flujo de genes entre las poblaciones estudiadas, es decir ha habido intercambio de genes y en algún momento se cruzaron entre sí.

Se calcularon las distancias genéticas de Nei (1978) entre las cuatro poblaciones caninas (Tabla 2) y se pudo observar que la población Cimarrón Uruguayo se encuentra más alejada genéticamente del resto de razas analizadas en este trabajo, mientras que las poblaciones más próximas han resultado ser Border Collie y Labrador Retriever, para estos loci estudiados.

Tabla 1: Resultados obtenidos en los estadísticos de Wright para los 26 loci en las cuatro razas caninas estudiadas.

Locus	FIS	FIT	FST	Nm	D
SNP1	0,12921	0,21054*	0,0934***	2,42666	0,09805
SNP2	-0,09618	<b>-0,00331</b>	0,08472***	2,7009	0,08853
SNP3	0,17639	0,29054**	0,1386***	1,55375	0,1492
SNP4	0,17639	0,29054**	0,1386***	1,55375	0,1492
SNP5	-0,10278	0,00483	0,09758***	2,312	0,10268
SNP6	0,60338***	<b>0,70127***</b>	0,24681***	0,76292	0,28344
SNP7	<b>-0,03520</b>	0,06809	0,09978***	2,25551	0,10512
SNP8	0,34324***	0,47082***	0,19395***	1,03899	0,21561
SNP9	<b>0,59435***</b>	-0,40301***	0,12001***	1,83316	0,12784
SNP10	<b>-0,51098***</b>	-0,29160**	0,14519***	1,47188	0,15688
SNP11	<b>-0,45929***</b>	-0,26497**	0,13316***	1,62744	0,1429
SNP12	<b>-0,85401***</b>	0,80114***	0,02852	8,51578	0,02893
SNP13	0,27669**	0,62575***	0,48259***	0,26804	0,65892
SNP14	<b>-0,49171***</b>	-0,47419***	0,01175	2,10266	0,01182
SNP15	<b>-0,64694***</b>	-0,63809***	<b>0,00537</b>	<b>46,30493</b>	<b>0,00538</b>
SNP16	<b>-0,71048***</b>	-0,68549***	0,01461	16,86157	0,01472
SNP17	<b>-0,08622</b>	-0,03254	0,04942*	4,80868	0,05068
SNP18	<b>-0,26992**</b>	-0,21255*	0,04517*	5,28465	0,04622
SNP19	<b>-0,05042</b>	0,00287	0,05073*	4,67805	0,05206
SNP20	<b>-0,79100***</b>	-0,73965***	0,02867	8,46992	0,02909
SNP21	<b>-0,19032</b>	0,00327	0,16264***	1,28714	0,1775
SNP22	0,14289	0,42023***	0,32358***	0,52261	0,39094
SNP23	<b>-0,54000***</b>	-0,37853***	0,10485***	2,13436	0,11076
SNP24	<b>-0,76737***</b>	-0,70650***	0,03444	7,009	0,03505
SNP25	<b>-0,72838***</b>	0,65489***	0,04252*	5,62959	0,04345
SNP26	<b>-0,10294</b>	0,50687***	<b>0,5529***</b>	<b>0,20216</b>	<b>0,80497</b>
Media	<b>-0,39331***</b>	<b>-0,18922</b>	<b>0,14648***</b>	<b>5,867</b>	<b>0,15692</b>

\*  $P < 0,05$

\*\*  $P < 0,01$

\*\*\*  $P < 0,001$

Tabla 2: Distancias genéticas de Nei (1978) para las 4 razas caninas estudiadas

Población	Cimarrón Uruguayo	Border Collie	Labrador Retriever	Pastor Alemán
Cimarrón Uruguayo	0,000			
Border Collie	<b>0,147</b>	0,000		
Labrador Retriever	0,109	<b>0,005</b>	0,000	
Pastor Alemán	0,100	0,040	0,025	0,000

### Prueba D de Tajima

Se estimó la prueba de la neutralidad de Tajima en los 26 loci de las 4 poblaciones, en este caso razas caninas analizadas (Tabla 3).

Tabla 3: Resultados del test de Tajima para los 26 loci analizados en las 4 razas caninas estudiadas

Gen	p*	N**	D (Tajima)	Significado
<i>MDR-1</i>	5	222	-0,973	ns***
<i>CYP1A2</i>	20	40	1,828	$P < 0,1$
<i>CYP2B11</i>	1	230	1,672	ns

\*P: número de polimorfismos

\*\*N: número de muestras

\*\*\*ns = diferencia no significativa ( $P > 0,1$ )

Los resultados indican que no se puede rechazar la hipótesis de neutralidad para los genes *MDR-1* y *CYP2B11*, mientras que para el gen *CYP1A2* la probabilidad de una desviación positiva de la hipótesis de neutralidad es inferior al 10%. Un valor positivo del estadístico D de Tajima se interpreta como una forma de selección disruptiva o equilibrado en el gen. Este mecanismo de selección favorece la existencia de polimorfismos en la población.

### Discusión

Se ha observado una alta variabilidad genética tanto dentro de cada población, como cuando se consideran las 4 poblaciones conjuntamente. La mayor parte de la diversidad

genética está dentro de las poblaciones ( $H_S = 0,2803$ ), pero también entre las poblaciones ( $DST = 0,0412$ ).

Los resultados obtenidos en este trabajo muestran que no hay endogamia dentro de las poblaciones ( $FIS = -0,39331$ ), al contrario de lo que cabría esperar. Por otra parte, los valores de  $N_m$  sugieren que existe un alto flujo de genes entre ellas ( $N_m = 5,867$ ), aunque hay que destacar que este estadístico se calcula a partir de los valores de  $FST$  o  $GST$ , en el supuesto de que la similitud o diferencia entre poblaciones es el resultado directo del flujo de genes. Sin embargo, la ligera similitud genética entre las poblaciones estudiadas ( $FST = 0,1464$  y  $GST = 0,1280$ ) puede ser debida a cuestiones históricas, ya que los loci están estrechamente vinculados a la resistencia o sensibilidad a los fármacos.

*A priori*, se esperaba que la deriva genética, como fuerza evolutiva que es, se presentara como un proceso determinante en la estructura genética de la población, sin embargo, no se encontró evidencia de la acción de la deriva, ya que los resultados obtenidos indican que es alta la variabilidad genética, luego el papel de la deriva no ha influenciado en la población, al menos hasta el momento.

Los resultados en términos de flujo de genes contradicen lo que se podía esperar teniendo en cuenta que las diferentes razas no suelen cruzarse entre sí, sin embargo, la similitud genética observada es probablemente debida a factores históricos, o bien se cruzaron antiguamente, o bien, los resultados están indicando un linaje común, como más probable.

En los resultados de la prueba de neutralidad, no se encontraron evidencias de que la diversidad genética descrita para estos tres genes se haya alcanzado a través de la selección, excepto probablemente para la conservación de los polimorfismos en el gen *CYP1A2*. Es decir, la variabilidad genética observada fue consistente con un equilibrio histórico que se habrá dado entre la deriva genética y las mutaciones que las sitúan muy cercanas a la neutralidad.

Cuando un gen parece desviarse del modelo de evolución neutra, se evalúa indirectamente la acción de las fuerzas selectivas. Si la variabilidad de ese gen no se ajusta a la expectativa de evolución neutra, se supone que estas desviaciones son el resultado de procesos selectivos subyacentes.

En el marco de la teoría de la evolución neutra, son esenciales dos parámetros para describir la diversidad genética a nivel molecular: uno es la diversidad de nucleótidos ( $\pi$ ) y otro la tasa de mutación ( $\theta$ ).

La diversidad de nucleótidos se define como el número de nucleótidos diferentes por sitio segregante (un sitio segregante es un sitio donde, al menos, difieren dos secuencias de la muestra) en dos secuencias extraídas al azar de la población. Y la tasa de mutación se define como  $\theta = 4N_e\mu$ , donde  $N_e$  representa el tamaño efectivo de la población y  $\mu$  es la tasa de mutación por sitio segregante. Un estimador importante de este último parámetro

se basa en el número de sitios segregantes en una muestra de secuencias:  $\theta = K/a$ , donde  $K$  es el número total de sitios segregantes y  $a = 1 + \frac{1}{2} + \dots + \frac{1}{n-1}$ , para  $n$  secuencias en la muestra (Pybus *et al.*, 2014).

Las particularidades de los estimadores de  $\theta$  son utilizadas por el estadístico D de Tajima para probar la neutralidad. Bajo la neutralidad, los estimadores tienen el mismo valor esperado y su diferencia debe ser cero. Sin embargo, las desviaciones significativas de cero indican que la selección (o alternativamente, ciertos procesos demográficos) ha afectado a la variabilidad existente.

En este estudio, el gen *CYP1A2* mostró una diferencia significativa lo que indica que un proceso evolutivo se ha producido. Este resultado se puede interpretar como que se trata de una forma de selección disruptiva o equilibrada, mecanismo que favorece la existencia de polimorfismos en la población. La selección equilibrada tiende a aumentar la variabilidad dentro de las poblaciones y favorece a los individuos que se encuentran en ambos extremos de la distribución fenotípica.

Por el contrario, para los genes *MDR-1* y *CYPB11* no se puede rechazar la hipótesis de neutralidad. Este resultado plantea la preocupación de si la prueba que se ha realizado en este trabajo tiene la suficiente potencia para detectar una desviación del modelo de la teoría neutra. Simonsen *et al.*, 1995, estudiaron el poder del estadístico D de Tajima y mostraron que, dada una muestra suficientemente grande de secuencias, la prueba tiene un alto poder estadístico, pero sólo para un espacio específico de tiempo. Y este espacio está más cercano al momento en que comenzó la selección y la intensidad de selección es más fuerte.

Nuestros resultados pueden situarse en estas condiciones ya que se supone que los loci *CYPB11* y *MDR-1* sólo han sido objeto de selección muy recientemente (hace aproximadamente 10 generaciones cuando se iniciaron los tratamientos clínicos) y que el intervalo de generación es de 3 años. Luego, en base a los resultados de Simonsen *et al.*, 1995, hay dos posibilidades de interpretación de los resultados de la prueba D de Tajima para estos dos genes: o bien se mantiene la hipótesis neutra, o bien la intensidad de selección que se ha producido ha sido tan débil que no ha dejado formas detectables, si se tiene en cuenta el reducido número de generaciones que han pasado desde que comenzó la selección.

En resumen, el gen *CYP1A2* mostró una diferencia significativa en la prueba D de Tajima, lo que indica la presencia de un proceso evolutivo, seguramente por selección indirecta debido a la respuesta negativa a los tratamientos farmacológicos clínicos, mientras los genes *CYPB11* y *MDR-1*, o bien mantienen una evolución neutra, o bien, aunque haya habido selección, ésta ha sido tan débil que no ha dejado genotipos diferentes evidenciables.

Estos resultados ayudan a esclarecer el proceso biológico de la selección natural, que es uno de los principales impulsores del cambio evolutivo y es la fuente de las adaptacio-

nes fenotípicas. Estos resultados contribuyen a una mejor comprensión de los procesos de selección de los fenotipos más aptos para evitar la resistencia al tratamiento clínico y el uso de los xenobióticos en la especie canina. Con estos resultados se facilitan los procedimientos clínicos, aconsejando un análisis genético de caracterización individual antes de la utilización de fármacos, al menos en las razas descritas en este trabajo.

## Referencias bibliográficas

Abecasis GR, Auton A, Brooks LD, DePristo MA, Durbin RM, Handsaker RE, Kang HM, Marth GT, McVean GA. 2012. The 1000 Genomes Project Consortium, An integrated map of genetic variation from 1092 human genomes. *Nature*, **491**: 56–65.

Akey JM. 2009. Constructing genomic maps of positive selection in humans: where do we go from here? *Genome Res.*, **19**:711–722.

Altschul SF, Madden TL, Schäffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W and Lipman DJ. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.*, **25**:3389-3402.

Arenas M, Weber CC, Liberles DA, Bastolla U. 2017. ProtASR: An evolutionary framework for ancestral protein reconstruction with selection on folding stability. *Syst. Biol.*, **5**:24-38.

Barreiro LB, Laval G, Quach H, Patin E, Quintana-Murci L. 2008. Natural selection has driven population differentiation in modern humans. *Nat. Genet.*, **40**:340–345.

Barrett RDH, Hoekstra HE. 2011. Molecular spandrels: tests of adaptation at the genetic level. *Nat. Rev. Genet.*, **12**:767–780.

Belkhir K, Borsa P, Chikhi L, Raufaste N and Bonhomme F. 1996. **GENETIX 4.05**, *logiciel sous Windows TM pour la génétique des populations*. Laboratoire Génome, Populations, Interactions, CNRS UMR 5171, Université de Montpellier II, Montpellier (France) <http://www.genetix.univ-montp2.fr/genetix/constr.htm#download>

Excoffier L, Laval G, Schneider. 2005. Arlequin (version 3.0): An integrated software package for population genetics data analysis. *Evol. Bioinform. Online*, **1**:47–50.

Gagliardi R, García CB, Llambí S, Arruga MV. 2013. Analysis of *mdr1-1Δ* mutation of MDR1 gene in the “Cimarron Uruguayo” dog. *MVZ Córdoba*, **18**(2):3480-3483.

Gagliardi R, Llambí S, Arruga MV. 2015. SNP Genetic Polymorphisms of *MDR-1*, *CYP1A2* and *CYP2B11* genes in four canine breeds upon toxicological evaluation. *J. Vet. Sci.*, **16**(3):273-280.

Gagliardi R, Llambí S, García CB, Arruga MV. 2011. Molecular study of gene *CYP2D15* (Cytochrome P450 2D15) in Cimarron Uruguayo dog. *AICA*, **1**:313-315.

- Hall TA. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium*, **41**:95-98.
- Hartl DL, Clark AG. 1997. *Principles of Population Genetics*. Sinauer Associates, Inc. Publishers. Sunderland, USA. 285 pp.
- Hedrick PW. 2000. *Genetics of Populations*, 2nd edn. Jones and Bartlett, Boston. MA. 315 pp.
- Kamimura H. 2006. Genetic polymorphism of cytochrome P450s in beagles: possible influence of *CYP1A2* deficiency on toxicological evaluations. *Arch. Toxicol.*, **80**:732-738.
- Kimura M. 1968. Evolutionary rate at the molecular level. *Nature*, **217**(129):624-626.
- Kimura M. 1983. *The neutral theory of molecular evolution*. Cambridge University Press. Cambridge.
- Li CC, Horvitz DG. 1953. Some methods of estimating the inbreeding coefficient. *Am. J. Hum. Genet.*, **5**(2):107-117.
- Nei M. 1978. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics*, **89**:583-590.
- Pybus M, Dall'Olio GM, Luisi P, Uzkudun M, Carreño-Torres A, Pavlidis P, Laayouni H, Bertranpetit J, Engelken J. 2014. 1000 Genomes Selection Browser 1.0: a genome browser dedicated to signatures of natural selection in modern humans. *Nucleic. Acids Research*, **42**. doi:10.1093/nar/gkt1188.
- Ross KA, Bigham AW, Edwards M, Gozdzik A, Suarez-Kurtz G, Parra EJ. 2010. Worldwide allele frequency distribution of four polymorphisms associated with warfarin dose requirements. *J. Hum. Genet.*, **55**:582-589.
- Simmons KL, Churchill GA, Aquadro CF. 1995. Properties of statistical tests of neutrality for ADN polymorphism data. *Genetics*, **141**:413-429.
- Slatkin M. 1987. Gene flow and the geographic structure of natural populations. *Science*, **236**(4803):787-792.
- Subramanian S. 2016. The effects of sample size on population genomic analyses- implications for the test neutrality. *BMC Genomics*, **17**:1-13.
- Tajima F. 1989. Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by ADN polymorphism. *Genetics*, **123**:585-595.
- Van Straalen NM, Roelofs D. 2012. *An Introduction to Ecological Genomics*. Oxford University Press. England. Second edition.
- Workman PL, Niswander JD. 1970. Population studies on southwestern Indian tribes,II: Local genetic differentiation in the Papago. *Am. J. Hum. Genet.*, **22**:24-49.