



UNIVERSIDAD VERACRUZANA

INSTITUTO DE NEUROETOLOGÍA

DOCTORADO EN NEUROETOLOGÍA

ANÁLISIS DEL POLIMORFISMO DERIVADO DE LA
AMPLIFICACIÓN AL AZAR DE ADN PARA IDENTIFICAR
MARCADORES GENÉTICOS ASOCIADOS CON DISPLASIA
COXO FEMORAL (DCF) EN EL PERRO (*Canis familiaris*)

Tesis

Que para obtener el grado de
Doctor en Neuroetología

Presenta:

Mtro. Miguel Canales Rubio

Director de tesis

Dr. Apolo Adolfo Carrasco García

Co-director

Dra. Patricia Cervantes Acosta

Comité tutorial

Dr. Antonio Hernández Beltrán

Dra. Mayvi Alvarado Olivares

MARZO 2015

El autor de este trabajo de Tesis agradece el apoyo recibido a través de las Becas de los siguientes organismos:

- Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología "CONACYT" por la beca otorgada con el número de CVU/ Becario: **235236/ 212198**, vigencia del 01 de Septiembre del 2007 al 31 de Enero del 2010.
- Programa de Mejoramiento del Profesorado "PROMEP" por la beca otorgada con el número de becario: **UV-449**, vigencia del 16 de Agosto del 2007 al 31 de Julio del 2010.

RECONOCIMIENTOS:

- A la Universidad Veracruzana. – Por las facilidades que me dio para realizar este posgrado.
- Al Instituto de Neuroetología de la Universidad Veracruzana.- Por brindarme la oportunidad de llevar a cabo este proyecto.
- A La Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia.- Por facilitar sus instalaciones para la investigación.
- Al Laboratorio de Biología Molecular de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Veracruzana.- Por permitirme llevar a cabo los trabajos de investigación y generosamente apoyarme en experiencia y conocimiento a través de su responsable la Dra. Patricia Cervantes Acosta.
- A mi Director de Tesis el Dr. Apolo Adolfo Carrasco García.- Por sus consejos y animarme a llevar a efecto este trabajo.
- A mi comité tutorial:
Dr. Apolo Adolfo Carrasco García
Dra. Patricia Cervantez Acosta
Dr. Antonio Hernández Beltran
Dra. Mayvi Alvarado Olivares
Porque con sus consejos y aportaciones fue posible terminar este proyecto.
- A la Dra. Patricia Cervantes Acosta.- Por todo su apoyo y confianza, por permitirme trabajar en su laboratorio y porque si ahora se algo de biología molecular, se lo debo a ella.

DEDICATORIA:

- A mi amada esposa La **Sra. Carlota Zamora Mora**.- Por ser mi fortaleza y estar conmigo en todas circunstancias. Corazón, te quiero mucho. Gracias por todo lo que significas en mi vida.
- A mis hijos **Miguel, Milly, Carlos y Karla**.- Estoy muy orgulloso de todos.
- A mi nieta **Montserrat**.

Con todo mi amor, a todos ustedes, por ser de alguna manera motivo de todos mis actos.

"ANALISIS DEL POLIMORFISMO DERIVADO DE LA AMPLIFICACIÓN AL AZAR DE
ADN PARA IDENTIFICAR MARCADORES GENÉTICOS ASOCIADOS CON DISPLASIA
COXO FEMORAL (DCF) EN EL PERRO (*Canis familiaris*)"

CONTENIDO

	Página
RESUMEN	
ABSTRACT	
1.- INTRODUCCIÓN	1
2.- ANTECEDENTES	3
2.1.- Anatomía, biomecánica, embriología, fisiopatología y patogenia de la articulación coxo-femoral.	3
2.2.- Etiología de la Displasia Coxo Femoral (DCF) en los perros.	13
2.3.- Prevalencia de la DCF.	19
2.4.- Diagnóstico de la DCF.	19
2.5.- Clasificación por grados de la DCF.	22
2.6.- Tratamiento de la DCF.	23
2.7.- Diagnóstico molecular.	24
3.- JUSTIFICACIÓN	27
4.-HIPÓTESIS	28
5.-OBJETIVOS	29
5.1.- Objetivo general.	29
5.2.- Objetivos Específicos.	29
6.- MATERIALES Y MÉTODOS	30
6.1.- Tamaño de muestra.	30
6.2.- Protocolos de diagnóstico clínico.	31
6.3.- Diagnóstico molecular	33
6.4.- Análisis estadístico	35
7.- RESULTADOS	37
8.- DISCUSIÓN	49
9.- CONCLUSIONES	52
10.- BIBLIOGRAFÍA	54
11.- ANEXOS	60

Lista de figuras, gráficos y cuadros.

Figuras

Figura 1.- Vista ventro dorsal de la cadera y la articulación coxo femoral.

Figura 2.- Cadera del perro y su situación en cuadrípedación.

Figura 3.- Radiografía en proyección ventro dorsal de la cadera sana del perro.

Figura 4.- Ilustración de un corte sagital de la articulación coxo femoral.

Figura 5.- Disección del acetábulo mostrando el ligamento redondo y el ligamento capsular.

Figura 6.- Distribución de los diferentes tejidos en una articulación.

Figura 7.- Trazo de la angulación para el cálculo del ángulo de Norberg.

Figura 8.- Sistema "*Pennhip*" donde se observa la distracción que existe entre la cavidad del acetábulo y la cabeza del fémur.

Figura 9.- Muestra el ángulo formado en las líneas A-B y A-C.

Figura 10.- Electroforesis de ADN en Agarosa 1% teñido con bromuro de etidio

Figura 11.- Electroforesis del marcador R55 en Agarosa 1.5 % teñido con bromuro de etidio [0.5 mg/mL]. Carril M: Marcador de peso molecular 50 pb DNA Promega®; Carril 1 y 3 ADN degradado, 2, 4-11, fragmentos amplificados de 700, 600 y 300 pb.

Figura 12.- Electroforesis del marcador OPW09 en Agarosa 1.5 % teñido con bromuro de etidio [0.5 mg/mL]. Carril M: Marcador 50 pb DNA Promega®; Carril 1 y 3 ADN degradado, 2, 4-11, fragmentos amplificados de 1100, 960 y 300 pb.

Figura 13.- Electroforesis del marcador R37 en Agarosa 1.5 % teñido con bromuro de etidio [0.5 mg/mL]. Carril M: Marcador 50 pb DNA Promega®; Carril 1, 3, 7,8, 10 y 11 ADN degradado, 2, 4, 5, 6, 9, fragmentos amplificados de 1000, 500 y 200 pb.

Figura. 14.- Electroforesis del marcador R105 en Agarosa 1.5 % teñido con bromuro de etidio [0.5 mg/mL]. Carril M: Marcador 50 pb DNA Promega®; Carril 1, 3, ADN degradado, 2, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 fragmentos amplificados de 1400, 1000, 850 y 725 pb.

Gráficas

Gráfica 1.- Resultado de las pruebas clínicas.

Gráfica 2.- Gráfica 2 Presencia de fragmentos de diferentes pares de bases (pb) del marcador R55 en perros positivos y negativos a DCF.

Gráfica 3.- Presencia de fragmentos de diferentes pares de bases (pb) del marcador OPW09 en perros positivos y negativos a DCF.

Gráfica 4.- Presencia de fragmentos de diferentes pares de bases (pb) del marcador R37 en perros positivos y negativos a DCF.

Gráfica 5.- Presencia de fragmentos de diferentes pares de bases (pb) del marcador R105 en perros positivos y negativos a DCF.

Gráfica 6.- Influencia homocigótica del marcador molecular R55 en perros clínicamente sanos a DCF, con peso > 25 Kg.

1 = Homocigoto; 2= Heterocigoto

Gráfica 7.- Influencia homocigótica del marcador molecular R55 en los perros clínicamente sanos a DCF. con peso < 25 kg

Gráfica 8.- Influencia homocigótica del marcador molecular R37 en los perros clínicamente sanos a DCF. con peso < 26 kg.

Gráfica 9.- Influencia homocigótica del marcador molecular R105 en los perros clínicamente sanos a DCF. con peso < 26 kg.

Cuadros

Cuadro 1.- Protocolo de tranquilización y anestesia para los perros que se sometieron a los estudios descritos.

Cuadro 2.- Especificaciones de la exposición para cada caso dependiendo del tamaño del paciente.

Cuadro 3.- Secuencias de las bases de cada microsatélite.

Cuadro 4.- Protocolo de amplificación por PCR, de los microsatélites R37, R55, R105 y OPW09 (Wang, *et.al.*, 1999).

Cuadro 5.- Distribución de las variantes alélicas observadas, alelos en pares de bases y frecuencias alélicas para los 4 microsatélites ensayados en 43 perros de razas diversas.

Cuadro 6.- Parámetros genéticos calculados a partir del análisis de 4 *loci* microsatélites, Heterocigosidad observada y esperada y desviaciones del equilibrio Hardy-Weinberg por Chi cuadrada.

Cuadro 7.- Correlación de Spermán (r^2) entre indicadores paraclínicos de perros susceptibles a desarrollar DCF y algunos marcadores moleculares asociados.

Cuadro 8.- Asociación entre algunas categorías paraclínicas y las obtenidas utilizando marcadores moleculares, relacionadas al diagnóstico sano/enfermo de DCF en perros.

RESUMEN

ANÁLISIS DEL POLIMORFISMO DERIVADO DE LA AMPLIFICACIÓN AL AZAR DE ADN PARA IDENTIFICAR MARCADORES GENÉTICOS ASOCIADOS CON DISPLASIA COXA FEMORAL (DCF) EN EL PERRO (*Canis familiaris*). Miguel Canales Rubio. Tesis de Grado. Doctorado en Neuroetología. Universidad Veracruzana. Xalapa, Veracruz. México. 2015.

El objetivo de esta investigación fue localizar a través de los marcadores OPW9, R55, R105 y R37 las mutaciones asociadas a DCF. Se utilizó ADN sanguíneo de 43 perros, 18 machos y 25 hembras con rango de edad de 1 a 11 años. A cada individuo se le realizaron las pruebas complementarias de signos clínicos, el "signo de Ortolani" y pruebas radiográficas para la medición del Ángulo de Norberg. Los marcadores se analizaron por RAPDs-PCR. En los resultados clínicos, 34 perros no presentaron DCF y 9 fueron positivos clínica y radiográficamente. En los cuatro microsatélites se detectaron un total de 15 alelos con un promedio de 3.75 alelos. La frecuencia de homocigotos por cada microsatélite presentó resultados de intermedios a elevados (0.53 – 0.93), R37 mostró valores intermedios entre homocigotos y heterocigotos, (0.53 y 0.47 respectivamente) en contraste con R55 que presentó la mayor frecuencia de Homocigotos (0.93) vs Heterocigotos (0.07). El análisis del Equilibrio de Hardy-Weinber ninguno los cuatro microsatélites presentó una desviación significativa para las comparaciones realizadas ($p=0,05$), y del análisis por la Chi cuadrada con un 95% de intervalo de confianza y 1 grado de libertad, ninguno de los microsatélites se relacionó significativamente a la enfermedad. El análisis estadístico incluyó pruebas de correlación de Spermán y Chi cuadrada, en grupos de perros compuestos de acuerdo a: la raza; (Lupoides y Molosoides), Jóvenes; <4 años y Adultos >4 años, Sexo; Machos y Hembras; en tanto que los marcadores moleculares se agruparon en Homocigotos y Heterocigotos; los resultados, indican que el diagnóstico clínico de DFC se ve influido por la raza, el peso y que la influencia de marcador molecular R55 en perros sanos, resulta significativos; (r^2 0.42, 0.34 y 0.30, respectivamente); al mismo tiempo la presencia o ausencia de DFC estaría influenciada en el caso del efecto Peso por los distintos microsatélites utilizados que a su vez influirían de una manera significativa ($P < 0.05$), tanto en perros con pesos mayores o menores a 25 kg. El efecto Raza estaría influyendo sobre DCF por animales Lupoides hembras jóvenes sanos, ($P < 0.05$) en tanto que, lo hacen en aquellos perros sanos asociados al marcador R55, tanto en homocigotos ($P < 0.05$) como heterocigotos ($P < 0.001$); para los casos de perros asociados al marcador molecular R57, se observó significancia para el caso de perros homocigotos enfermos ($P < 0.05$) y heterocigotos sanos ($P < 0.05$), Por su parte, los marcadores R105 y OPW9 lo hacen para perros heterocigotos sanos ($P < 0.001$) y ($P < 0.05$), respectivamente. Estos hallazgos permiten concluir que utilizar marcadores independientes sobre DCF arroja resultados débiles y que debe incluirse una evaluación clínica previa para el estudio de asociación genética de enfermedades caninas complejas, para obtener una mejor comprensión de las vías bioquímicas en la laxitud de la cadera y la displasia en los individuos que la padezcan.

Palabras clave: PCR, RAPDs, DCF, marcadores moleculares, articulación.

ABSTRACT

POLYMORPHISM ANALYSIS OF RESULT OF RANDOM AMPLIFICATION OF GENETIC MARKERS TO IDENTIFY DNA ASSOCIATED WITH FEMORAL DISPLASIA COXO (DCF) IN THE DOG (*Canis familiaris*). Miguel Canales Rubio. Tesis de Grado. Doctorado en Neuroetología. Universidad Veracruzana. Xalapa, Veracruz. México. 2015.

The objective of this research was to locate through the OPW9, R55, R105 and R37 markers the mutations associated to the DCF. Sanguine DNA from 43 dogs was used, 18 males and 25 females with age range from 1 to 11 years old. Each individual were conducted with complementary tests of clinical signs, the "Ortolani sign" and radiographic tests to measure the Norberg Angle. The markers were analyzed by RAPDs-PCR. The clinic results showed that 34 dogs didn't DCF and 9 were positive clinically and radiographically. In 4 micro-satellites were detected a total number of 15 alleles with an average of 3.75 alleles. The frequency of homozygotes for each microsatellite presented results from intermediate to high (0.53 – 0.93), R37 showed intermediate values between homozygous and heterozygous (0.53 and 0.47 respectively), in contrast to R55 that had the highest frequency of homozygous (0.93) vs heterozygotes (0.07). Considering the analysis of Hardy-Weinberg, none of the four microsatellites showed a significant deviation for comparisons ($p = 0.05$), meanwhile the analysis for Chi square matches with 95% confidence interval and 1 degree of freedom, none of microsatellites was significantly related to the disease. The statistical analysis included Spearman correlation tests and Chi-square, in dog groups composed according to: race; (Lupoids and Molosoids) Young; <4 years and Adults> 4 years, Sex; Males and females; while the molecular markers were grouped in homozygous and heterozygous; the results indicated that the clinical diagnosis of DCF is influenced by race, weight and the influence of molecular marker R55 in healthy dogs, is significant; (R^2 0.42, 0.34 and 0.30, respectively); at the same time the presence or absence of DCF would be influenced in the case of Weight's effect by the different micro-satellites used, which in turn influence significantly ($P < 0.05$), both kind of dogs, with weights greater or less than 25 kg. The Race effect would be influencing DCF for Lupoid young female healthy animals, ($P < 0.05$) while this same association can influence the expression of the marker R55, both homozygotes ($P < 0.05$) and heterozygotes ($P < 0.001$); for cases of dogs associated to the molecular marker R57, it was observed significance for the case of dogs homozygous patients with disease ($P < 0.05$) and healthy heterozygotes ($P < 0.05$), while in the other hand, the R105 and OPW9 markers do for healthy heterozygous dogs ($P < 0.001$) ($P < 0.05$), respectively. These findings support the conclusion that using separate or independent markers on DCF yields poor results, and that a previous clinical evaluation for genetic association study of complex diseases in dogs must be included to obtain a better understanding of the biochemical pathways in the laxity of the hip dysplasia in individuals who develop it.

KEYWORDS: PCR, RAPDs, DCF, MICRO-SATELLITES ,ARTICULATION.

1.-INTRODUCCIÓN

La palabra displasia deriva del griego *dys* (anormal) y *plassein* (formación), es decir, una formación anormal de la articulación coxo-femoral (Morgan, *et al.*, 2000). En perros fue descrita por primera vez en 1935, se observó que afecta sobre todo a razas grandes y medianas, de rápido crecimiento y maduración, que consumen dietas de alto valor calórico y que presentan disminución de las masas musculares pélvicas y anomalías del músculo pectíneo. Es la enfermedad ortopédica de los perros más común y consiste en una mala congruencia de la cavidad acetabular con las cabezas femorales que pueden aparecer luxadas o subluxadas (Morgan, *et al.*, 2000; Olmstead, *et al.*, 2000; Hou, *et al.*, 2010).

Una definición más descriptiva de la displasia coxo - femoral es: "un grado variable de laxitud de la cadera que permite la subluxación durante la etapa inicial de la vida originando un grado variable de pérdida de la profundidad acetabular y aplanamiento de la cabeza femoral y, por último, alcanzar la inevitable artrosis" (Morgan, *et al.*, 2000).

Olmstead *et al.* (2000), reportaron fuertes evidencias acerca de que, la principal característica de la displasia de cadera, es la laxitud articular presente en el comienzo de la vida que conduce a la subluxación de la cabeza femoral, que da como resultado la falla del desarrollo del acetábulo respecto a la formación de una cavidad profunda, que mantenga en una posición adecuada a la cabeza femoral, a lo que también se asocian, la modelación irregular del borde acetabular, la cabeza femoral y el cuello femoral. Estos factores, conducen al desarrollo de una superficie articular incongruente que causa el progreso de una artrosis secundaria. Por otro lado, se reporta que la DCF llega a tener una frecuencia del 75% en razas puras y mezcladas, algo así como 70 millones de perros tan solo en EUA (Zhengkui, *et al.*, 2010).

Un factor de retraso en el diagnóstico de esta enfermedad se debe a que usualmente se diagnostica a través de estudios radiográficos en diferentes etapas de desarrollo del perro (de 12 a 14 meses de edad). Se han realizado investigaciones con el objetivo de mejorar las técnicas de diagnóstico e incrementar el conocimiento que se tiene con respecto a las enfermedades que aquejan a los perros y que demeritan su calidad de vida. Todhunter, *et al.* (2003), reportaron resultados sobre la heredabilidad de los rasgos y expresiones genéticas hasta en cuatro generaciones de razas específicas sobre todo Labrador Retriever y Grayhound; se ha mapeado con diferentes técnicas el genoma del perro en búsqueda de los diferentes *locus* relacionados con la enfermedad y se ha

observado que son varios los cromosomas que participan en el componente genético del padecimiento (Blis, *et al.*, 2002; Todhunter, *et al.*, 2003).

Las técnicas moleculares han demostrado que esta patología es de origen poligenético, ya que la mayor parte del genoma del perro posee genes asociados a la DCF (Blis *et al.*, 2002; Todhunter, *et al.*, 2003; Cargill, *et al.*, 2004). Los resultados hasta ahora emitidos se refieren a razas particulares, (Blis *et al.*, 2002; Semyenova, *et al.*, 2002; Todhunter, *et al.*, 2003; Tsai y Murphy., 2006), pero no se han reportado resultados que permitan establecer un diagnóstico precoz en otras razas que se atienden en la clínica veterinaria de rutina. El diagnóstico a través de microsatélites se considera una opción, ya que las secuencias al azar de ADN permitirían el diagnóstico en cualquier raza, por la técnica de análisis de Reacción en Cadena de la Polimerasa y Polimorfismo Derivado de la Amplificación al Azar (PCR-RAPDs por sus siglas en inglés), (Siriwadee, *et al.*, 2014). El análisis temprano de la enfermedad permitiría establecer estrategias de selección genética asistida por marcadores, que eviten la reproducción de animales con alta probabilidad de transmitir la enfermedad a su descendencia, considerando además el criterio de conservar la salud del paciente y el efecto negativo que genera esta condición patológica al entorno familiar de sus propietarios.

2.-ANTECEDENTES

2.1.- Anatomía, biomecánica, embriología y fisiopatología de la articulación coxofemoral.

La cadera es una articulación diartrodial que permite un rango de movimiento en flexión y extensión, combinado con la abducción y aducción. Está formada por el cinturón pélvico óseo y el hueso fémur estabilizado por el ligamento redondo intra-articular y una consistente cápsula articular (Evans y Christensen , 1979).

Los límites del movimiento resultan del incremento gradual de tensión de los tejidos blandos, sin ninguna posición de bloqueo como sucede en otras articulaciones (Morgan, *et al.*, 1999).

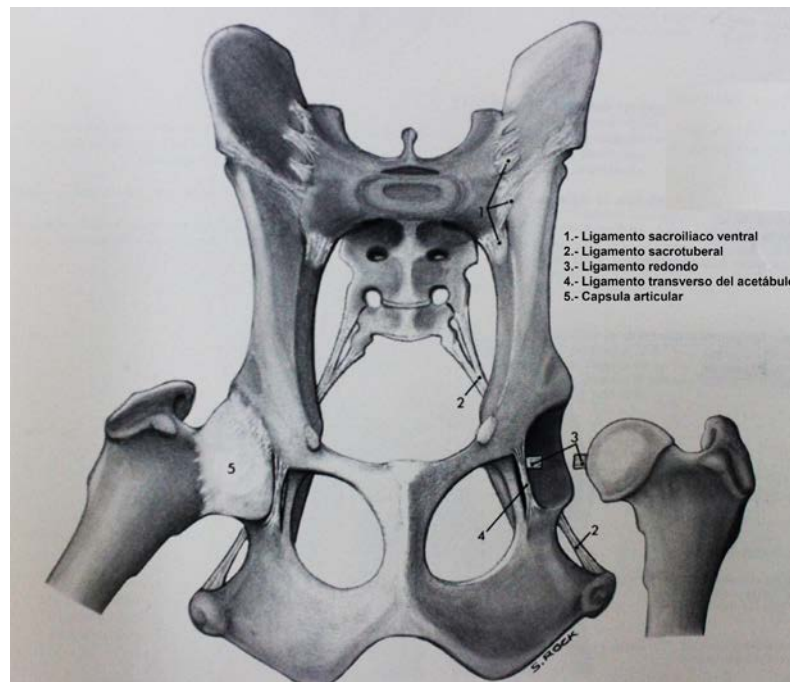


Figura 1.- Vista ventrodorsal de la cadera y la articulación coxofemoral. (Budras, *et al.*, 1989)

La cadera es única, porque no hay otra articulación del perro que trabaje tanto en estación como al caminar con una superficie de apoyo sobre la cabeza femoral con apoyo horizontal incompleto. Esto significa que el acetábulo no forma una cobertura completa sobre la cabeza femoral lo que permite un escape o luxación más fácil hacia dorsal y lateral.



Figura. 2 .- Cadera del perro y su situación en cuadrípedación. (Gil, *et al.*,1997)



Figura 3 .- Radiografía en proyección ventro dorsal de la cadera sana del perro. (Canales, 2015).

Huesos del cinturón del miembro pelviano.

El esqueleto del cinturón del miembro pelviano queda integrado por tres piezas óseas –ilion, isquion y pubis- que forman un solo bloque esquelético: el hueso Coxal. Los huesos coxales de ambos lados se unen en la línea media ventral, en tanto que dorsalmente no contactan entre sí, sino que se articulan con el hueso sacro para formar, con este hueso y con los ligamentos que los unen, la Pelvis (Evans y Christensen, 1979).

El acetábulo está formado por los cuerpos de los huesos ilion, isquion y pubis. Es una gran cavidad articular para la cabeza del fémur. Está marginado por un borde del acetábulo. En su interior encontramos una cara semilunar propiamente articular y, en profundidad, la fosa del acetábulo, rugosa, en la que se fija el ligamento de la cabeza del fémur o ligamento redondo. Ventralmente está limitado por la escotadura del acetábulo (Evans y Christensen, 1979).



Figura. 4 .- Ilustración de un corte sagital de la articulación coxo femoral (Página principal. Cirugía ortopédica University of Chicago, Medicine, 2015)

El Fémur:

El hueso fémur es el hueso más sólido del esqueleto. En la epífisis proximal diferenciamos la cabeza del fémur, medialmente excavada en la fovea de la cabeza, que recibe al ligamento de la cabeza del fémur. La cabeza del fémur queda separada del resto del hueso por el cuello del fémur. Lateralmente destaca el trocánter mayor, excavado caudalmente por la fosa trocantérica; medialmente destaca el trocánter menor, unido al trocánter mayor por la cresta intertrocantérica

(Caudalmente) y a la cabeza del fémur por la línea intertrocantérica (Cranealmente). Distalmente el hueso se continúa con la diáfisis y la epífisis distal (Evans y Christensen, 1979).

Articulación coxofemoral.

Es una articulación sinovial esferoidal que se establece entre la cabeza del fémur y el acetábulo del hueso coxal. Al ser la cabeza del fémur más grande que la cavidad acetabular, se desarrolla un labro acetabular, o rodete fibroso, que se inserta en el reborde óseo del acetábulo y que amplía la cavidad acetabular. Como nexos de unión destacamos:

- Ligamento transverso del acetábulo: es la continuación del labro acetabular a nivel de la escotadura acetabular (porciones ventrales del acetábulo).
- Ligamento de la cabeza del fémur o ligamento redondo: se extiende desde la fosa del acetábulo hasta la fóvea de la cabeza del fémur.
- Cápsula y ligamento articular: laxa pero resistente.

(Evans y Christensen, 1979).

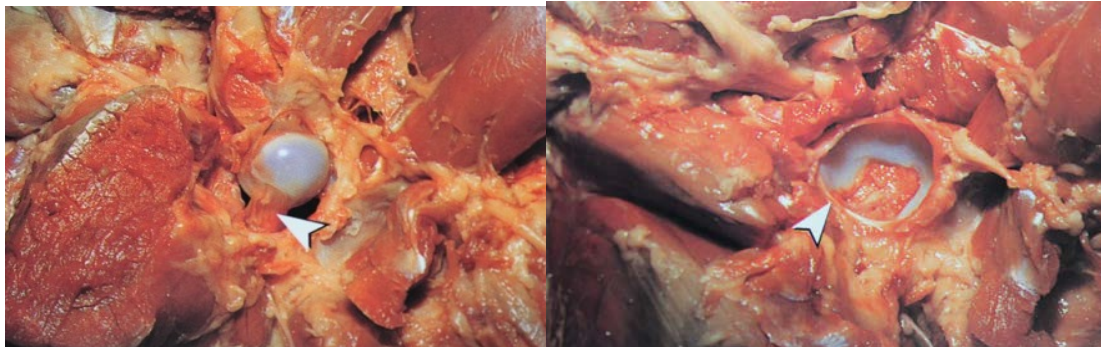


Figura. 5 .- Disección del acetábulo mostrando el ligamento redondo y el ligamento capsular (Gil, *et.al.* 1997).

Biomecánica:

En lo concerniente a la biomecánica, el fémur confluye con la pelvis de manera que permite una máxima estabilidad y campo de movimientos. El acetábulo es un hueco profundo que cubre la cabeza femoral. El recubrimiento de la cabeza femoral se puede valorar de forma subjetiva en la radiografía ventrodorsal y mediante la medición del ángulo acetabular de Wiberg (ángulo de Norberg-Olsson) o el índice acetabular de Rodees-Jenny. El ángulo de Wiberg, formado por el centro de la cabeza femoral, el labio externo del acetábulo y una línea perpendicular al eje

longitudinal del cuerpo, tiene que sobrepasar los 105° (Evans y Christensen, 1979; Morgan *et al.*, 1999).

El acetábulo posee un techo cráneo-dorsal que es perpendicular a una fuerza femoral hacia arriba. Si el techo acetabular inclina la cabeza femoral, ésta se luxa con más facilidad. Se deben generar fuerzas adicionales mediante el grupo muscular abductor en la cápsula articular para mantener la cabeza femoral en el acetábulo. La carga total de la articulación de la cadera aumenta con la inclinación del techo acetabular. El engrosamiento del hueso acetabular subcondral se denomina caja acetabular. La caja acetabular está más engrosada en la cara craneodorsal del acetábulo e indica la zona de mayor tensión intraarticular. El hecho de que la mayor tensión intraarticular sea cráneo-dorsal y no dorsal es importante para el conocimiento de la biomecánica de la articulación de la cadera. Además, el acetábulo normal tiene una inclinación posterior o retroversión de $5-10^\circ$ (Morgan *et al.*, 1999).

El fémur posee una configuración biomecánica importante. El ángulo diáfisis-cuello femoral tiene dos componentes. El ángulo de inclinación es el que se observa en el plano frontal (dorsal), siendo en condiciones normales de 146° . Se relaciona con la técnica de medición, la posición y el ángulo de ante versión, pero no se relaciona con la edad, sexo o raza. El ángulo de ante versión es el que se observa en el plano transversal, siendo en condiciones normales de 27° . Se puede medir mediante la observación inferior de la diáfisis femoral o mediante trigonometría y dos proyecciones radiológicas (Morgan *et al.*, 1999).

La longitud del cuello femoral y la posición del trocánter mayor en relación con la cabeza femoral, es también importante. El extremo proximal del trocánter mayor tiene que estar aproximadamente a nivel, o sólo muy poco distal, con la parte proximal de la cabeza femoral. Esta distancia se denomina "distancia artículo-trocantérica" (Evans y Christensen, 1979; Morgan *et al.*, 1999).

La tensión intraarticular de la articulación de la cadera es de 4.4 veces la carga colocada en la extremidad del perro en posición normal. El eje del centro de gravedad del perro está medial a la articulación de la cadera. Por tanto, el apoyo del peso de la carga que se coloca en la cadera tiene una torsión con un brazo de apoyo igual a la distancia desde el centro de gravedad al centro de la cabeza femoral. Esta torsión se tiene que compensar mediante una torsión opuesta pero igual, que se genera mediante los músculos abductores (glúteos), con un brazo de apoyo perpendicular al vector del músculo glúteo y que se extiende al centro de la cabeza femoral (Evans y Christensen, 1979; Morgan *et al.*, 1999).

La suma del peso (fuerza de carga) y de la fuerza del músculo abductor, conduce a una carga intraarticular que sobrepasa el peso corporal. La carga

intraarticular se orienta a lo largo de las líneas de tensión trabeculares del fémur proximal. Los factores críticos que determinan la fuerza de la musculatura abductora y la carga intraarticular en el perro en posición vertical son: ángulo de inclinación del cuello femoral, longitud del cuello femoral, posición del trocánter mayor, distancia de la cabeza femoral desde el centro de gravedad (Evans y Christensen, 1979; Morgan *et al.*, 1999).

En el cuadrúpedo que se mueve, la mayoría de las fuerzas intraarticulares se orientan de forma craneal en un plano horizontal, de forma opuesta a las fuerzas que se orientan de forma vertical en el animal que está parado. Este hecho se recalca mediante la observación de la caja acetabular engrosada en la porción cráneo-dorsal. Por tanto, el ángulo de ante versión o la angulación craneal de la cabeza y del cuello femoral asume una gran importancia (Morgan *et al.*, 1999).

La biomecánica del ángulo de ante versión no está bien definida como la biomecánica del ángulo de inclinación. Unos ángulos de ante versión excesivos conducen a un aumento de las fuerzas intraarticulares.

Las fuerzas intraarticulares de la articulación de la cadera sobrepasan de forma marcada el peso de la carga colocada en la cadera. Esta tensión se acrecienta con un aumento del ángulo de inclinación, con un aumento del ángulo de anteversión, con un cuello femoral corto y con un desplazamiento distal o medial del trocánter mayor. Además, las tensiones intraarticulares son mayores si la distancia desde la cabeza femoral hasta el centro de gravedad aumenta, el incremento ocurre con frecuencia de forma clínica en la luxación de la cabeza femoral (Morgan *et al.*, 1999).

Desarrollo embrionario de las articulaciones:

En la zona en la que ha de formarse una articulación de movimiento libre (diartrosis) entre dos huesos, al principio, solo se observa una concentración vagamente delimitada precartilaginosa de mesénquima. Gradualmente el mesénquima se condensa y se hace más perceptible en las zonas en donde está a punto de iniciarse la formación de cartílago.

A medida que más se definen los esbozos cartilagosos de los futuros huesos, la articulación se sitúa entre ellos como una zona en que el mesénquima se encuentra menos concentrado. Al formarse el pericóndrio, se extiende alrededor de las epífisis óseas de manera que en el lugar en que ha de formarse la articulación habrá durante algún tiempo una zona de tejido conjuntivo fibroso joven laxamente entretejido (Patten, 1974).

Mientras la osificación comienza en la diáfisis, sus extremidades epifisiarias permanecen en estado cartilaginoso. El adelgazamiento y la desaparición final del tejido conjuntivo en torno a las epífisis forman la cavidad de la articulación. Aún después de haber aparecido los centros de osificación epifisiarias, las extremidades articulares de los huesos en una articulación diartrodial siguen revestidos de cartílago, que proporciona una suave superficie de contacto, lubricada por el fluido sinovial de la cavidad articular (Patten, 1974).

El cartílago.

El cartílago es un material firme, elástico que cubre las puntas de los huesos en las articulaciones normales. Está principalmente compuesto por agua y proteínas cuya función principal es reducir la fricción en las articulaciones y servir para "amortiguar los golpes". La calidad amortiguadora del cartílago normal viene de su habilidad de cambiar de forma cuando la comprimen, debido a su alto contenido en agua (Figura 1). Aunque el cartílago se puede reparar un poco cuando se daña, el cuerpo no regenera cartílago nuevo después de una lesión.

El cartílago está formado de dos elementos principales: una sustancia parecida a la gelatina llamada matriz y compuesta principalmente por agua y dos tipos de proteína – colágeno y proteo-glicógenos – y células llamadas condrocitos que están contenidas en la matriz.

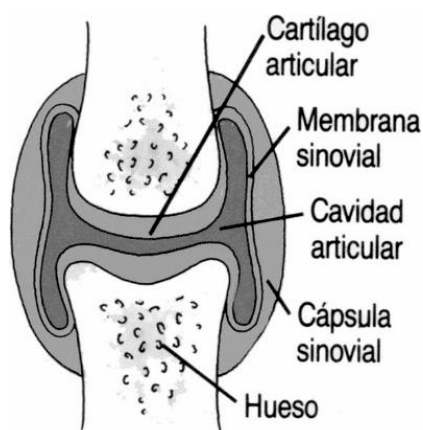


Figura 6.- Distribución de los diferentes tejidos en una articulación (elsevier, 2015)

El colágeno es una proteína estructural que se encuentra en muchos tejidos como la piel, los tendones y el hueso, y es un componente estructural clave del cartílago. El colágeno le proporciona al cartílago su fuerza y crea el marco para los otros componentes del cartílago.

Los proteo-glicógenos son unas moléculas complejas compuestas de combinaciones de proteína y azúcar que están entrelazadas en la matriz del cartílago. Su función es atrapar grandes cantidades de agua en el cartílago, lo que

le permite cambiar de forma cuando es presionado actuando así como amortiguador de golpes.

El agua forma gran parte del cartílago sano. El agua ayuda a formar la matriz gelatinosa con los otros elementos en el contorno, permitiendo al cartílago funcionar como amortiguador de golpes para la articulación. En las enfermedades como la osteoartritis, el cartílago pierde mucha de su contenido de agua. Esta pérdida de agua disminuye la protección de la articulación.

Los condrocitos son células cartilaginosas multi-funcionales altamente complejas. Sus funciones incluyen la producción de colágeno, proteo-glicógenos y las enzimas que se encargan de mantener el cartílago sano. A medida que se forma el cartílago, estas células migran a través de las diferentes capas del cartílago, mientras cambian mediante mecanismos que no se entienden completamente (San Román, 2000).

Componentes de la matriz extra celular:

Proteoglicanos

Una apreciación de la estructura de los proteoglicanos es fundamental para entender la función de estas moléculas en el cartílago articular. Los proteoglicanos están compuestos por numerosas cadenas de glucosaminoglicanos que están unidos de manera covalente a una proteína central.

Los glucosaminoglicanos son unidades de disacáridos unidos en los que uno de los azúcares se une a un azúcar aminosulfatado .

Existen cuatro glucosaminoglicanos que pueden asociarse con proteoglicanos: Hialuronan coindritin sulfato, dermatan sulfato, heparan sulfato y keratan sulfato.

La distinción entre los glucosaminoglicanos son los restos de los azúcares, el tipo de unión entre los restos y el número y localización de los grupos sulfato (San Román, 2000).

Colágeno:

Es el segundo componente básico de los componentes del cartílago articular. El colágeno está compuesto por una triple hélice de cadenas (polipeptídicas). La alta proporción de los restos de hidroxilina e hidroxiprolina en la cadena de polipéptidos son comunes a otras proteínas de origen animal. Las moléculas de colágenos se encuentran unidas en las fibras de colágenos que tienen un Diámetro de 10/300 nm. Las moléculas de H⁺ intercadenas y las uniones curvas

intramoleculares covalentes se integran entre los restos de la lisina y las hélices triples en las fibras de colágeno (San Román, 2000).

Fisiología articular:

El cartílago articular se ha especializado para proveer una superficie suave, de baja fricción y muy resistente a las fuerzas de compresión que son inherentes a las articulaciones artrodiales. Las relaciones fisiológicas de las características estructurales individuales de los proteoglicanos y colágenos en una única matriz extracelular aumentan la capacidad del cartílago articular de funcionar adecuadamente. Los proteoglicanos proveen de capacidad de hidratación altamente especializada formada por una función de la naturaleza altamente sulfatada de los proteoglicanos y por otro lado las fibras de colágeno están sometidas a una tensión extrema la resistencia que es inherente a la estructura fibrilar del colágeno y protegida por las uniones cerradas entre las moléculas de colágeno.

Como resultado el cartílago articular es un material bifásico, la fase sólida reforzada por fibras y permeable-porosa y una fase fluida que elimina líquidos libremente. Es precisamente esta naturaleza bifásica la que confiere al cartílago articular las propiedades biomecánicas necesarias para contrarrestar el estrés asociado con la función articular normal (San Román, 2000).

Los proteoglicanos son hidrofílicos por naturaleza y facilitan el agua estructural retenida en su matriz. El grado de infiltración es limitado al 20% de máximo, ya que los proteoglicanos están embebidos en una matriz de fibras de colágeno. De estas relaciones proteoglicanos hidratados y colágeno se consigue la salud y el mantenimiento del cartílago articular (San Román, 2000).

Las interrelaciones entre los proteoglicanos y el colágeno son críticas para la habilidad de la matriz del cartílago articular para responder a las fuerzas compresivas. Durante la carga, las fuerzas de compresión colocadas sobre el cartílago fuerzan la fase líquida a fluir a través de la fase sólida: La fuerza hidráulica incrementa conforme incrementa las fuerzas de compresión: La deformación del cartílago continúa hasta que se equilibren la fuerza de compresión y la fuerza hidráulica (San Román, 2000)

Patogenia de la displasia de cadera.

La displasia coxo-femoral (DCF) es una enfermedad biomecánica que se caracteriza por una incongruencia articular progresiva, provocada a partir de una laxitud articular y que se expresa como una enfermedad articular degenerativa en distintos grados (Smith, *et al.*, 2001); no se trata de una enfermedad congénita sino de un problema hereditario ya que para que se presente se requiere de tener

los genes de displasia y las manifestaciones clínicas dependerán de los factores ambientales como la alimentación y el ejercicio entre otras (Roush, 2004).

La fase inicial de la enfermedad es típicamente asintomática, caracterizada por una sinovitis leve no supurativa relacionada con: 1) Aumento del volumen del líquido sinovial, 2) engrosamiento de la membrana sinovial, 3) engrosamiento de la cápsula fibrosa articular, 4) engrosamiento del ligamento redondo de la cabeza femoral, 5) prominencia del labio acetabular cartilaginoso y 6) lesiones degenerativas focales en el cartílago articular. La subluxación en esta etapa temprana de la vida no siempre es detectada con seguridad en las evaluaciones radiográficas al utilizar técnicas sin estrés (Olmstead, *et al.*, 2000).

Cualquier factor que influya en el asentamiento apropiado de la cabeza femoral dentro de la cavidad acetabular, solo o unido a otros factores tales como crecimiento rápido, causaran el desarrollo de una artrosis (Olmstead, *et al.*, 2000).

Un factor importante en el desarrollo de la artrosis es que la articulación de la cadera del perro soporta cargas mucho mayores que las del peso corporal. Durante la estación en 3 patas sin acción de avance, la cadera está sujeta a una fuerza de 1.5 veces el peso corporal. De esta manera, la cabeza femoral soporta el peso corporal que la empuja hacia abajo, mientras que las fuerzas musculares la empujan hacia el acetábulo, causando la acción de fuerzas sobre las superficies articulares.

Se puede considerar a la displasia de cadera como el resultado de un desafío entre las fuerzas de apoyo y la maduración de cartílago a hueso. Si el cartílago puede convertirse a hueso formando una cadera normal antes de que las fuerzas anormales ejerzan su acción sobre la cadera será factible evitar la displasia. Sin embargo si el modelo cartilaginoso sufre malformaciones previas a la conversión final a hueso se presentará una osteoartritis y consecuentemente la articulación de uno o de los dos lados será displásica (Morgan, *et al.*, 2000; Wilson, 2011).

La osteoartritis es una enfermedad articular degenerativa caracterizada por alteraciones en la integridad del cartílago y el hueso subcondral. Su patogenia es compleja debido a que factores genéticos, metabólicos y locales interactúan y originan un proceso de deterioro del cartílago con acción proliferativa del hueso subcondral e inflamación sinovial (Fernández, *et al.*, 2007; Runge, *et al.*, 2010).

La biología del condrocito debe de ser clave en el inicio, la progresión y el desarrollo de la afección. Los factores que tienen relevancia en el desarrollo de esta enfermedad son varios entre los que destacan, la raza, el tamaño, el estilo de vida y desde luego la genética (Argente, 2000; Clemens, *et al.*, 2006; Fernández, *et al.*, 2007).

Factores genéticos

La genética de esta enfermedad es compleja debido a que generalmente no sigue los patrones de la herencia mendeliana y como se ha mencionado ya anteriormente, está asociada a la interacción de múltiples genes (Cicuttini, 1996; Argente, 2000; Fernández, *et al.*, 2007).

La investigación de la osteoartritis como una enfermedad genética ha dado lugar a un aumento en la cantidad de las investigaciones en el área de la epigenética. Estos cambios fueron definidos por alteraciones genéticas que no producen alteraciones en las secuencias de ADN que involucren una mutación (Dylan, *et al.*, 2010). Estos procesos están envueltos fundamentalmente en la metilación o acetilación de ADN en donde este es deshabilitado para ser transcrito y es conocido como un importante mecanismo durante el desarrollo para que se presente o no la Osteoartritis. El rol de estos mecanismos está cobrando una gran importancia recientemente (Maher, *et al.*, 2008).

Genes candidatos que confieren susceptibilidad a la osteoartrosis y consecuentemente a la DCF

Tradicionalmente se consideran tres aproximaciones para identificar genes que confieren susceptibilidad a enfermedades complejas: Exploración amplia del genoma por asociación, (*Genome Wide Linkage Scan*), Exploración al azar para la identificación de posibles polimorfismos y estudio de genes candidatos.

Exploración amplia del genoma por asociación no requiere conocimiento previo de la naturaleza del gen, ya que está basado en la naturaleza del genoma en busca de genes asociados de alguna manera a la enfermedad. Es una técnica cara que requiere del genotipado de numerosos marcadores polimórficos en un gran número de individuos afectados pertenecientes a la misma familia. Mediante la utilización de esta técnica se han detectado las relaciones existentes entre los cromosomas 4, 9, 10 y 11 ($p < 0.01$), 16, 20, 22, 25 y 29 ($p < 0.01$), 30, 35, 37, 38 y 39 en los sitios protegidos de los QTL. (Todhunter, 2005, 2003). Y la afección, lo cual pone de manifiesto nuevamente la compleja naturaleza de la transmisión de la enfermedad (Cicuttini y Spector, 1996; Fernández, *et al.*, 2007).

La exploración al azar en búsqueda del polimorfismo es una técnica que requiere solamente microsatélites

Estudio de genes candidatos, está más orientado a la búsqueda de alteraciones en un gen, por lo que se requiere de un conocimiento tanto de su función como de su posible papel en la enfermedad.

2.2.- Etiología de la displasia coxo-femoral en los perros.

A continuación se describen algunos de los factores genéticos y ambientales que influyen en el desarrollo de la DCF.

Factor genético:

Como una enfermedad hereditaria, la DCF la transmiten los perros a sus crías por medio de la información contenida en su código genético. Por lo tanto, si el perro no tiene los genes para la displasia no puede tener displasia y no es capaz de transmitir la enfermedad a sus crías. Por otro lado, si un perro tiene todos o algunos de los genes para la displasia: 1) la enfermedad puede no expresarse por sí misma y el perro será fenotípicamente normal o 2) el perro mostrará un grado variable de displasia (Morgan, *et al.*, 2000). De esta manera, el nivel de la enfermedad expresado depende en parte de un número o tipo de genes presentes y en parte de componentes ambientales. Algunos de estos factores se conocen pero otros no. Se sabe que la DCF tiene un índice de heredabilidad variable que depende de la raza y que va de 0 a 1.0 de acuerdo con (Sánchez, 1997; Woolliams, 2011).

La estimación de la heredabilidad para la DCF varía según los diferentes investigadores, teniendo en cuenta que ante una mayor heredabilidad mayor es el control de la enfermedad por medio de los efectos de la transmisión genética. Si la heredabilidad estimada es de 0 (0.0%), significa que la característica no tiene componentes genéticos, mientras que una heredabilidad de 1 (100%), significa que la expresión de la característica es totalmente genética (Morgan, *et al.*, 2001).

Es posible interpretar de forma incorrecta una heredabilidad estimada de 0.3, por ejemplo: sugiriendo que significa que el 30% tiene displasia de tipo hereditario y el 70% de los perros tiene displasia debida a factores de tipo ambientales. En lugar de esto, una heredabilidad estimada de 0.3 indica que el 30% de los cambios observados son de tipo genético mientras que el 70% restante se deben a factores ambientales (Morgan, *et al.*, 2001).

Estudios recientes hechos para la British Veterinary Association reportan un índice de heredabilidad del 0.35 ± 0.02 en perros Labrador Retriever (Woolliams, 2011).

Genes candidatos que tienen relación con los procesos de maduración y transformación del cartílago.

El gen SLC26A2:

Proporciona instrucciones para hacer una proteína que transporta moléculas (iones), en particular los iones sulfato, a través de las membranas celulares. El cartílago es un duro y flexible tejido que conforma gran parte del esqueleto durante

las primeras etapas del desarrollo. La mayoría de cartílago es más tarde convertido a hueso, a excepción de los cartílagos que sirven para cubrir y proteger los extremos de los huesos y están presentes en la nariz y los oídos externos.

Las células del cartílago es decir los condrocitos hacen uso de la proteína codificada por el gen SLC26A2 para construir moléculas llamadas proteoglicanos. Estas moléculas, que constan de varios azúcares adjuntos a una proteína, ayudan a dar al cartílago elástico una estructura semejante a un gel. Dado que los iones sulfato están obligados a hacer proteoglicanos, la actividad de transporte de la SLC26A2 proteína es esencial para la formación de cartílago normal (Genome Home Referens, 2015).

El gen COL2A1

El nombre oficial de este gen es "Colagen Type II alpha 1."

Este gen, proporciona instrucciones para la fabricación del colágeno de tipo II, que se encuentra principalmente en el cartílago que es un tejido duro pero flexible que constituye gran parte del esqueleto durante las primeras etapas del desarrollo. La mayoría del cartílago se convertirá más tarde en hueso a excepción de los cartílagos que sirven para cubrir y proteger los extremos de los huesos y está presente en la nariz y los oídos externos (Clements, *et al.*, 2006; Rubini, *et al.*, 2008; Genome Home Referens, 2015).

El gen COL2A1 proporciona la información para que las células del cartílago produzcan la unidad esencial del colágeno que está constituida por tres cadenas de polipéptidos que aparecen entrelazadas formando una triple hélice, constituyendo una unidad macromolecular denominada tropocolágeno. Las moléculas de colágeno se asocian formando polímeros que corresponden a las fibrillas colágenas visibles al microscopio electrónico las cuales pueden tener cientos de milímetros de largo y presentan una estriación transversal característica repetida cada 67 nanómetros, la que refleja la disposición regularmente espaciada de las moléculas de colágeno. El diámetro de las fibrillas varía entre 10 y 300 nanómetros, según el tipo de colágeno de que se trate. Las moléculas de colágeno son largas y rectas formadas por la asociación de una estructura helicoidal de tres cadenas polipeptídicas. Cada cadena contiene unos 100 aminoácidos ordenados como una hélice hacia la izquierda con tres aminoácidos por vuelta correspondiendo siempre la glicina al tercer residuo, de manera que cada cadena está compuesta por una serie de secuencias de la tripleta -Gly-X-Y-, en la cual X ó Y corresponden con gran frecuencia prolina o hidroxiprolina respectivamente.

En el caso de la especie humana se han encontrado una importante cantidad de cambios en los polipéptidos precursores del colágeno y cuya producción está

mediada por el gen COL2 A1 en los que en concreto, el aminoácido glicina se substituye por uno diferente en diversos lugares de las cadenas. Estas mutaciones dan lugar a graves anomalías esqueléticas como la hipocondrogenésis, la displasia espondiloepifisial y metaepifisial ya que al substituirse el aminoácido glicina en la cadena la triple hélice pierde estabilidad (Genome Home Referens, 2015).

Otro trastorno asociado con el gen COL2A1 y sus mutaciones que tiene una gran relación con la articulación coxo-femoral tanto en humanos como en perros es la necrosis avascular de la cabeza del fémur que provoca un inadecuado riego sanguíneo en los extremos proximales de los huesos debilitando estos. Esta situación se da fundamentalmente en individuos adultos o la enfermedad de *legg calves Perthes* en animales jóvenes y regularmente de razas pequeñas (Genome Home Referens, 2015).

En el caso del humano, se han hecho trabajos en los que se ha buscado la asociación de las mutaciones del gen y la presentación de problemas osteoartritis y displásicos sin embargo el estudio de las condrodisplasias se ha visto limitado debido al gran número de mutaciones y a la alta variabilidad de las presentaciones clínicas fenotípicas. (Cicutini, 1996; Donahue, *et al.*, 2003; Rubini, *et al.*, 2008 ; Zhengkui, 2010).

Por lo que respecta al trabajo en perros, se han realizado algunos en razas específicas y poblaciones cerradas de labrador retriever referentes a osteoartritis en la displasia de codo no ha encontrado una asociación significativa (Salg, *et al.*, 2006). Sin embargo otros autores mencionan que la expresión de los genes relacionados con la síntesis del colágeno se encuentra aumentada en aquellos perros no afectados con osteoartritis (Clements, 2006; Dylan, 2010).

El gen IL1A

El nombre oficial del gen es " La Interleucina 1 alfa".

La función normal del gen IL1A contiene las instrucciones para hacer una proteína llamada interleucina 1 alfa. Las interleucinas son un grupo de proteínas que se sintetizan principalmente en células del sistema inmunitario. Están involucradas en la comunicación celular y tienen una amplia variedad de funciones dentro del sistema inmune. La interleucina 1 alfa se describe como "pro-inflamatoria" , ya que estimula la actividad de los genes implicados en la inflamación y la inmunidad. Esta proteína juega un papel fundamental en la protección del cuerpo de invasores del cuerpo extraños como las bacterias y los virus. También participa en la resorción ósea. La distribución y la eliminación de tejido óseo que ya no es necesario (Genome Home Referens, 2015).

El gen IL1B

La proteína codificada por este gen es un miembro de la familia de las citoquinas interleuquina 1, beta (IL1B) y modula una gran cantidad de interleucina 1-alfa relacionadas con las respuestas inmunes e inflamatorias. Este gen y otros cinco genes estrechamente relacionados en el humano con la forma de citoquinas abarcan un grupo de genes de aproximadamente 400 kb en el cromosoma 2. Un polimorfismo de este gen se informa que se asocia con mayor riesgo de fracturas osteoporóticas y cáncer gástrico. Transcripción empalmados alternativamente cuatro variables distintas han sido reportados (Genome Home Referens, 2015).

El gen IL1RN

Este gen sintetiza una proteína antagonista de los receptores de las interleucinas 1-alfa. Antagonista de los receptores de tipo II intracelular del receptor de Interleucina-1 (ICIL-1ra) (Genome Home Referens, 2015).

El gen TGFB1

El nombre oficial de este gen es el de "Factor de crecimiento transformador beta 1", este gen proporciona instrucciones para la producción de una proteína llamada factor de crecimiento transformador beta-1. Esta misma proteína ayuda a controlar el crecimiento y la división (multiplicación) de las células, el proceso por el cual las células maduras pueden llevar a cabo funciones específicas (diferenciación), movimiento celular (motilidad) y la autodestrucción de la misma (apoptosis). La proteína se encuentra en todo el cuerpo y juega un papel importante en el desarrollo antes de nacimiento, la formación de vasos sanguíneos, la regulación de tejido muscular y grasa corporal; es particularmente abundante en los tejidos que componen el esqueleto, donde ayuda a regular el crecimiento del hueso, y en el intrincado entramado que se forma entre los espacios entre las células formando la matriz extracelular. Dentro de las células esta proteína se encuentra inactiva hasta que recibe una señal química para ser activa (Genome Home Referens, 2015).

El gen GNAS

El nombre oficial de este gen es el de "Locus GNAS complejo".

Este gen contiene instrucciones para la fabricación de un componente, la unidad alfa-estimulante de un complejo proteico llamado guanina-proteína de unión de nucleótidos (proteína G) Cada proteína G se compone de tres proteínas llamadas alfa, beta, gama y subunidades.

En un proceso llamado transducción de señales, las proteínas G desencadenan una compleja red de vías de señalización que en última instancia influyen en muchas de las funciones celulares que regulan la actividad de las hormonas. La proteína producida por el gen GNAS ayuda a estimular la actividad de una enzima llamada adelinato-ciclasa que a su vez participa en el control de varias hormonas que regulan la actividad de las glándulas endocrinas como la tiroides, la glándula pituitaria, las gónadas y las glándulas suprarrenales. Adelinato-ciclasa se cree que desempeña un papel clave en vías de señalización que participan en el desarrollo de los huesos (osteogénesis). De esta forma la enzima ayuda a evitar la formación de tejido óseo en el lugar equivocado (hueso ectópico) (Genome Home Referens, 2015).

El gen STAT3

El nombre oficial de este gen es el de “Señal de transductor y activador de la transcripción 3” (factor de respuesta de fase aguda).

Este gen es parte de una familia conocida como STAT genes. Estos genes proporcionan la información para hacer proteínas que forman parte esencial para hacer la señalización química dentro de las células. Cuando las proteínas STAT son activadas por ciertas señales químicas estas se mueven en el núcleo y juntan u obligan a las áreas específicas de ADN procurando una reglamentación para la unión de las regiones próximas a los genes. Las proteínas STAT pueden regular si estos genes se activan o desactivan. Se llaman factores de transcripción sobre la base de esta acción (Genome Home Referens, 2015).

El gen ESR1

Este gen codifica una proteína receptora de estrógeno, un factor de transcripción activado que compone varios ámbitos vinculantes para la hormona vinculante. Los estrógenos y sus receptores son esenciales para el desarrollo sexual, pero también desempeña una función en otros tejidos como el hueso (Genome Home Referens, 2015).

Factores ambientales

Entre los factores que van a influir en la aparición de la displasia se encuentra la alimentación; cachorros con dietas hipocalóricas presentan menos incidencia y con cuadros menos graves que los alimentados con dietas ricas en calorías. Se ha demostrado que un exceso de peso en relación a la media, según raza y sexo, a los 60 días de edad, aumenta los riesgos de aparición de displasia (Sánchez, 1997).

Un exceso de alimentación ligado generalmente al hábito de ingesta "At libitum" influye sobre la velocidad de crecimiento del animal. Un animal joven con la arquitectura ósea aún no compacta que ha de soportar un peso excesivo, será más propenso a desarrollar DCF. Debe de evitarse la alimentación con exceso de proteínas, calorías, calcio, anabólicos etc. Sobre todo en la edad de máximo crecimiento: entre los 3 y los 8 meses.

Por lo que respecta al factor de ejercicio, si este es muy violento en un animal joven se incrementa la laxitud articular porque el contacto de la cabeza femoral con el acetábulo no es homogéneo no congruente, el exceso de laxitud funcional al apoyar conlleva al desgaste del cartílago que inevitablemente desarrollará osteoartritis (Lust, 2001; Morgan, 2001).

2.3.- Prevalencia de la DCF.

La información general en relación con la distribución de la DCF en el mundo se puede obtener dirigiéndose a un informe sobre el control de la enfermedad realizado en Suiza con información de los pasados 24 años, donde el 42% de todos los perros de razas puras permanecen afectados a pesar de los programas de control en los últimos 30 años (Morgan, 2001).

2.4.-Diagnóstico de la DCF.

Tradicionalmente la DCF se diagnostica mediante una combinación de los elementos que conforman la propeútica veterinaria comenzando por los datos clínicos, la observación del paciente, examen físico y fundamentalmente examen radiológico (Smith, 1997).

En perros jóvenes aparecen los primeros síntomas después del cambio de dentadura de caducos a permanentes, sobre los 4 o 5 meses, notándose dolor después del ejercicio, se levantan con dificultad del tercio posterior, presentan dolor a la manipulación, juntan los corvejones, debilidad muscular y al correr las patas traseras van dando saltos al mismo tiempo tal y como lo hace un conejo.

No existe correlación entre los signos radiológicos y los síntomas. Algunos animales con displasia grave pueden mostrarse asintomático y en cambio otros con displasia menos severa pueden presentar signos graves e incluso invalidantes (Smith, 1997).

Examen físico

El examen físico se puede realizar con el perro echado sobre un lado o parado sobre el piso o la mesa de consulta. El tamaño del perro influirá en cómo se

realizará el examen, siendo los perros más grandes mejor examinados en el piso. La revisión del perro echado de lado sobre la mesa de consulta (en decúbito lateral) Puede ser más fácil tanto para el médico veterinario como para el perro. El examen se puede llevar a cabo con el perro despierto, sedado o anestesiado. El propietario, el tamaño y la conducta del perro, así como también el tiempo que se dispone para el examen, son los factores decisivos influyentes. Al examinar un perro despierto, la tensión muscular puede ser fuerte impidiendo de ese modo la detección de dolor o el movimiento anormal de la articulación. Si el perro es sedado o anestesiado, se obtiene una mayor relajación muscular y el examen puede efectuarse con mayor seguridad. El dolor será aún evidente con el perro bajo sedación pero se perderá bajo anestesia. Quizás el mejor método para llevar a cabo el examen sea con el perro despierto lo más que se pueda, ya sea en estación o en decúbito lateral, y luego terminar el examen con el perro anestesiado para efectuar la radiografía pélvica (Morgan, 2001; Bell, 2002).

La palpación durante el examen físico permite la determinación del rango de movimiento de la cadera, la detección del dolor y la crepitación.

La articulación puede ser examinada forzando el miembro a los movimientos de:

1) Extensión y flexión, 2) abducción y aducción y 3) rotación interna y externa.

Durante el movimiento del miembro se puede percibir la crepitación o la sensación de un movimiento tosco de las superficies de los cartílagos articulares.

Laxitud articular como indicador de DCF "signo de Ortolani":

Se dispone de dos métodos para la detección de la laxitud articular: la palpación y la radiografía. En la palpación de una cadera normal, la cabeza femoral permanece dentro del acetábulo y no hay un signo externo que indique laxitud articular.

La presencia de signo de "Ortolani" es un indicador de luxación de la cabeza femoral y es aceptado como un signo de displasia (Morgan, 2001).

Esta maniobra es más fácil de realizar con el perro en decúbito dorsal, con el fémur perpendicular a la camilla. Con una mano colocada alrededor de la rodilla flexionada, el fémur es aducido y se aplica presión contra la rodilla, en dirección a la camilla. Esto produce que la cabeza femoral salga del acetábulo en una articulación con laxitud anormal. En algunas caderas se puede percibir el "deslizamiento" de la cabeza femoral. Luego se abduce el fémur y se percibe la sensación de "salto" o un "clik" en el momento en que la cabeza femoral retorna al acetábulo en el perro afectado (Morgan, 2001).

El signo de Ortolani positivo, es generado en la articulación displásica en la medida que la cabeza femoral es forzada a una subluxación dorsal y luego retorna dentro del acetábulo.

El "clik" o ruido seco que se oye o se percibe a medida que la cabeza del fémur vuelve a entrar en el acetábulo es un "signo de Ortolani" positivo y una indicación de laxitud articular.

Si la cadera es normal o si las alteraciones artríticas del acetábulo evitan la salida y entrada de la cabeza femoral en el mismo, el "signo de Ortolani" es negativo.

El signo de Ortolani: Con una mano colocada sobre la rodilla de la extremidad afectada, aplicar una presión dorsal al hueso desde una posición de aducción a otra de abducción, el "clik" o ruido seco que se escucha o se percibe a medida que la cabeza del fémur vuelve a entrar en el acetábulo es un signo de Ortolani positivo y una indicación de laxitud articular (Puerto, *et al.*, 1999; Olmstead, 2000; Fujiki, *et al.*, 2004).

Ángulo de Norberg.

Norberg describió que el ángulo de la línea de unión de los centros de ambas cabezas femorales y el borde anterior del acetábulo en la articulación femoral sana es de 105° o más, y a este ángulo se le denomina ángulo según Norberg. Este ángulo se obtiene con las radiografías hechas con las extremidades extendidas dorsoventralmente y rotación interna las patelas paralelamente a la placa radiográfica (Burk, *et al.*, 1996; Puerto, 1999; Lust, *et al.*, 2001; Ohlerth, *et al.*, 2001; Kapatkin, *et al.*, 2004; Thibaut, *et al.*, 2005; IVOT, 2007; Tarrago, 2015).

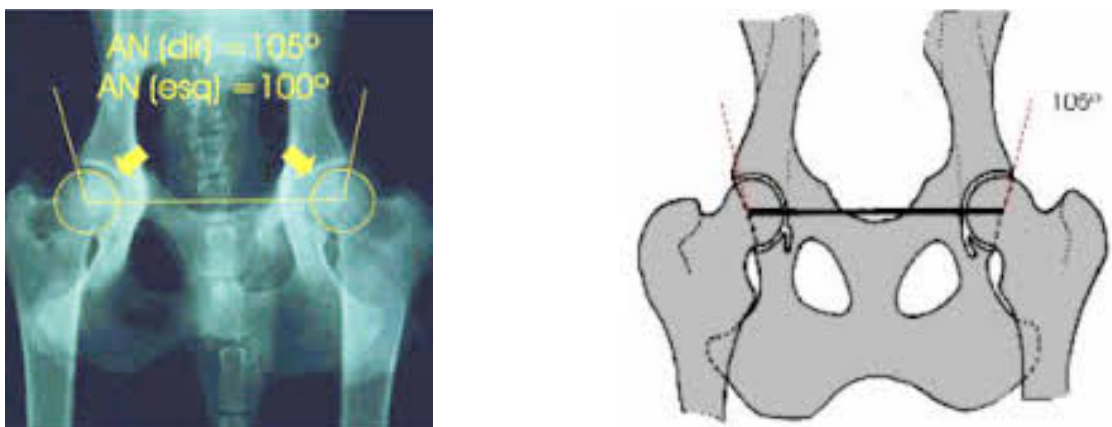


Figura 7.- Trazo de la angulación para el cálculo del Ángulo de Norberg (Tarrago, 2015)

Sistema pennHIP (Universidad de Pensilvania).

Es una tecnología para el diagnóstico radiográfico de la cadera desarrollada en la Universidad de Pensilvania (Pennsylvania Hip Improvement Program) y que consiste fundamentalmente en hacer una evaluación cuantitativa del índice de distracción o laxitud de la articulación sobre todo antes de que ocurran cambios osteoartrotríticos en los animales (Smith, 1997).

Se ha determinado que muchas ocasiones perros con buenos fenotipos y libres de signos clínicos a la DCF resultan positivos en las radiografías para evaluar el índice de distracción (Powers, 2010).



Figura 8 .- Sistema "Pennhip", donde se observa la distracción que existe entre la cavidad del acetábulo y la cabeza del fémur. (IVOT, 2015)

2.5.-Clasificación por grados de la DCF (5)

1.- Sin indicio de displasia de la articulación coxofemoral 0-0: La cabeza del fémur y el acetábulo son congruentes, y el ángulo según NORBERG (en posición: miembros extendidos) es de 105° o más. El reborde cráneo lateral del acetábulo está afilado o ligeramente redondeado. El intersticio articular es estrecho y uniforme (Tarrago, 2015).

La radiografía ventro dorsal de una cadera normal muestra una cabeza femoral bien formada, con una perfecta adaptación a la superficie articular del acetábulo, que a su vez es profundo y abarca o recibe más de la mitad de la cabeza del fémur (Tarrago, 2015).

2.- Forma de transición (sospecha de DC) 0-1: La cabeza del fémur y el acetábulo son en un escaso grado incongruentes con un ángulo Norberg de 105° o más, o bien el ángulo Norberg es inferior a 105° , siendo congruentes la cabeza femoral y el acetábulo. Puede haber pequeñas faltas de precisión en el borde craneal, caudal o dorsal del acetábulo.

El concepto de «sospecha de DC» ha sido ampliamente reemplazado por la expresión de «forma de transición» o «caso límite». Quiere decirse con ello que en tales casos no se trata de animales con una DC diagnosticada, sino más bien de formas articulares todavía dentro del marco de la zona de variación anatómica (Tarrago, 2015).

3.- DC Ligera 1º: La cabeza del fémur y el acetábulo son incongruentes, el ángulo Norberg es alrededor de 100° y/o el reborde craneal lateral está ligeramente aplanado. Puede haber faltas de precisión o como máximo, ligeros indicios de alteraciones osteoartrosicas en el reborde craneal, caudal o dorsal del acetábulo.

Una displasia leve muestra un ligero desplazamiento lateral de la cabeza femoral, permitiendo movimiento o juego dentro de la articulación, lo que podría provocar con el tiempo, una osteoartritis degenerativa secundaria, con signos de artrosis y cambios en la imagen de la articulación. Muchas veces este estado puede no ser acompañado por signos clínicos (Tarrago, 2015).

4.- DC Mediana 2º: Clara incongruencia entre la cabeza del fémur y el acetábulo, con sub-luxación. El ángulo Norberg es superior a 90° (sólo como referencia). Aplanamiento del reborde craneal del acetábulo y/o señales osteoartrosicas.

La cabeza del fémur puede no ser esférica. El cuello del fémur adopta a menudo una forma cilíndrica y puede verse más corto (Tarrago, 2015).

5.- DC Grave 3º y 4º : Llamativas alteraciones displásicas en las articulaciones de la cadera, así como, p. ej., luxación o acentuada sub-luxación, ángulo Norberg inferior a 90° , claro aplanamiento del reborde craneal del acetábulo, deformación de la cabeza del fémur (forma de seta, aplanada) u otras señales osteoartrosicas.

En casos de sub luxación o luxación completa, donde las cabezas femorales mantienen una muy escasa superficie de contacto con los acetábulos, los signos clínicos se presentan con todo el abanico de posibilidades. Radiológicamente los cambios son muy evidentes: Osteoartritis degenerativa de los acetábulos, tendencia al aplanamiento, artrosis y osteofitos alrededor y en la superficie articular, deformación de las cabezas y cuellos femorales, refuerzos de la cápsula articular y resistencia a la extensión y a la buena posición de los miembros (Tarrago, 2015).

2.7.- Diagnóstico molecular:

El diagnóstico de la DCF puede ser utilizando selección en las razas y líneas genéticas susceptibles de perros basados en la valoración y estimación de fenotipos y desde luego utilizando sistemas que detecten en el componente genético aquellos individuos que tarde o temprano puedan cursar la enfermedad y evitar la aparición de signos y síntomas que conduzcan a la enfermedad articular degenerativa (Ginja 2010).

De lo mencionado hasta el momento con respecto al diagnóstico, tratamiento y pronóstico de la DCF. Ninguno de los métodos descritos anteriormente tienen una capacidad diagnóstica del 100% de seguridad (Todhunter, 2005) y lo que si es cierto es que actualmente sigue existiendo una alta presencia de la enfermedad a casi 80 años de que se describiera como una entidad metabólica degenerativa de los perros.

Esto último seguramente ha provocado que diversos investigadores y estudiosos de la salud de los perros se motiven en buscar otros sistemas que complementen los actuales, o bien, que optimicen los recursos y que se encuentren a la altura de las expectativas de los criadores de esta especie animal. Es por eso, que actualmente la posibilidad de diagnóstico a través de biología molecular es una técnica que se debe tomar en cuenta (Guo, 2011; Verhoeven, 2011).

Los polimorfismos genéticos son variantes del genoma que aparecen por mutaciones en algunos individuos, se transmiten a la descendencia y adquieren cierta frecuencia en la población tras múltiples generaciones. Se ha estimado que hay una variante en cada 1,000 pares de bases de los 3,000 millones que configuran el genoma humano. Los polimorfismos son la base de la evolución y los que se consolidan bien pueden ser silentes y proporcionar ventajas al individuo aunque también pueden contribuir a causar enfermedades (Iniesta, 2005).

En el caso del ser humano se trabaja constantemente en la búsqueda de estos polimorfismos y su localización, no siendo lo mismo en los animales sobre todo en los perros que por no ser especies de producción de alimentos no se considera prioritaria la investigación en esta misma.

Las técnicas moleculares permiten detectar la variación de los polimorfismos existentes entre los individuos de una población a través de regiones específicas de ADN este polimorfismo puede ser utilizado para construir mapas genéticos y en la evaluación de las diferencias entre marcadores en la expresión de rasgos particulares en una familia que están fuertemente señalados marcando un efecto de las diferencias en términos de la determinación genética de este rasgo (Montaldo y Meza 1998).

Los marcadores moleculares son usados en la biomedicina con el fin de hacer análisis genómicos (localizar genéticamente donde se encuentran los rasgos de

interés), para hacer mapas genéticos, clonación de genes, diagnósticos médicos e identificación de características para mejoramiento de plantas y animales (Shadt, 2006). Los diferentes tipos de marcadores moleculares se distinguen entre ellos por las diferencias en la capacidad para detectar polimorfismos en locus únicos o múltiples (Soto *et al.*, 2002).

Todhunter *et al.*(2003), Han hecho trabajos sobre la heredabilidad de los rasgos y expresiones genéticas hasta en cuatro generaciones de razas específicas sobre todo Labrador Retriever y Grayhound; se ha mapeado con diferentes técnicas el genoma del perro en búsqueda de los diferentes locus relacionados con la enfermedad (Blis, *et al.*, 2002). Se sabe en este momento que los factores de expresión de la DCF con relativamente de pequeño efecto en el fenotipo del animal (Es decir, en apariencia el animal cumple con los estándares de raza y guarda una apariencia normal), se debe a un gran número de genes (Todhunter, *et al.*, 2005).

De esta manera estudios realizados con 240 microsatélites distribuidos en 38 autosomas y en el cromosoma X en una población de 152 perros pertenecientes a 3 generaciones de perros de distintas razas y con diagnósticos diferentes en los sistemas tradicionales descritos en este mismo trabajo que se obtuvieron niveles de significancia estadística para cada uno de los sitios donde se encontraran Quantitative Trait Loci (QTL) y fue $p < 0.05$ para cada uno de los QTL. En los cromosomas 4, 9, 10 y 11 ($p < 0.01$), 16, 20, 22, 25 y 29 ($p < 0.01$), 30,35, 37 ,38 y 39 en los sitios protegidos de los QTL. (Todhunter, *et al.*, 2005, 2003).

Por lo que respecta al uso de RAPDs (Randomly Amplified Polimorphic DNA) para la identificación de marcadores asociados a la DCF en los perros la experiencia de Wang *et al.*, (1999), reportan que utilizando 12 perros de la raza Boykin spaniel de tres generaciones en los que encontró mediante sistemas clínicos de diagnóstico animales confirmados a DCF y los sometió a pruebas moleculares con decanucleotidos y enzimas de restricción encontrando una gran cantidad de polimorfismos que para algunos casos se observó asociación con el sexo, como el caso de primer opw09, pero por otro lado se encontró que para el primer R105 generaron bandas de alrededor de 1000 bp en todos los miembros de la familia pero en dos diferentes intensidades; en el primer grupo en los que están incluidos los perros 2,3,6,9,y 11 que dieron bandas de alta intensidad todos los perros con excepción del 3 y 6 fueron diagnosticados positivos a DCF en el otro grupo con bandas de menor intensidad pero en el mismo nivel en los que en los perros 4 y 10 también fueron diagnosticados con DCF (Wang, *et al.*, 1999).

De lo observado por estos investigadores se deduce que los primers utilizados por ellos en los 12 perros de los cuales 7 fueron confirmados a la DCF para el caso del opw 9 se encontró un polimorfismo que diferenciaba machos y hembras con una exactitud del 100% mientras que el primer R105 identificó 5 de 7 perros diagnosticados con DCF (Wang, *et al.*, 1999).

3.- JUSTIFICACIÓN.

La ocurrencia de algunas enfermedades en los perros y la importancia intrínseca de estos como mascotas para el hombre en un entorno compartido, lo convierten en una especie de interés para la búsqueda de genes que subyacen a enfermedades relevantes también para los seres humanos. Una situación común es la displasia de cadera con notable similitud en su expresión clínica y patogénesis tanto en el hombre como en el perro. Las patologías hereditarias de origen genético como la Displasia Coxofemoral (DCF) se producen por la acción de distintas mutaciones en el ADN del genoma eucariótico. La DCF es una enfermedad hereditaria y progresiva, con distribución discontinua y de origen poligénico o multifactorial, en ella el genotipo del individuo está determinado por los efectos individuales de un gran número de genes independientes entre sí, pero que al interactuar con el ambiente, se favorece su expresión. La DCF posee una variación subyacente y un "umbral" que genera una división discreta en la expresión fenotípica del carácter. En los perros, el diagnóstico temprano de esta enfermedad por grupos de investigación con el uso de marcadores moleculares, es un objetivo continuo en la búsqueda de las regiones del genoma para localizar los genes que desencadenan la DCF en esta especie, por lo que el diagnóstico molecular con microsatélites en perros de diversas razas, contribuirá al conocimiento de este problema de salud, conjunto al examen del fenotipo que valide las secuencias de los microsatélites útiles para el diagnóstico temprano de esta enfermedad.

4.-HIPÓTESIS:

- El uso de marcadores moleculares del ADN, facilita el diagnóstico de la Displasia Coxofemoral en perros de diversas razas y su identificación previa a las manifestaciones clínicas de la enfermedad.
- Los marcadores moleculares OPW9, R105, R37 y R55 permiten identificar regiones polimórficas en el ADN, asociadas a la DCF en perros de diversas razas.

5.-OBJETIVOS:

5.1 Objetivo general:

Identificar y caracterizar mediante polimorfismos de ADN amplificados al azar, marcadores moleculares asociados a DCF en perros portadores.

5.2 Objetivos específicos:

5.2.1 Identificar la Displasia Coxofemoral por pruebas clínicas y radiográficas, en 43 perros de diversas razas

5.2.2 Amplificar los microsatélites OPW9, R105, R37 y R55 en el ADN de perros de los perros analizados clínicamente.

5.2.3 Identificar la asociación del polimorfismo en ADN de los microsatélites OPW9, R105, R37 y R55 con los animales clínicamente positivos a Displasia Coxofemoral

6.- MATERIALES Y MÉTODOS

6.1.- Tamaño de muestra.

Se seleccionaron al azar un total de 43 perros, tomando en cuenta el criterio de la *Internacional Society of Animal Genetics* (ISAG 1997) el cual indica que para análisis con marcadores moleculares solo son suficientes 25 individuos los cuales producen 50 alelos por cada locus estudiado, y para el estudio de composición genética de un grupo el tamaño óptimo de muestra va de 30 a 60 individuos (Nei, 1987)

El grupo de trabajo se conformó con perros de diferentes razas, de más de 6 meses de edad sin importar el sexo, peso y color, tal y como se presentan en el trabajo cotidiano de una clínica veterinaria (Al azar).

De cada individuo, se integró un expediente previa autorización y consentimiento de los propietarios.

Los protocolos de signos clínicos y estudios radiográficos se llevaron a cabo en las instalaciones de una clínica privada y los estudios moleculares se realizaron en el laboratorio de Biología Molecular de la Unidad de Diagnóstico de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Veracruzana.

Con la intención de normar un criterio homogéneo para todos los perros participantes en cuanto a la utilización de sedantes y anestésicos, durante los procedimientos clínicos, estos se harán como sigue:

Cuadro 1.- Protocolo de tranquilización y anestésico para los perros que se sometieron a los estudios descritos (IVOT 2007)

Observación de signos clínicos en dinámica y en estación.	Sin medicamento alguno.
Palpación para determinar dolor.	Con sedantes de tipo hipnótico tal como la xilacina en dosis de 0.3 mg. / Kg. De P.V.
Signo de Ortolani.	Sedantes de tipo Hipnótico tal como la xilacina en dosis de 0.3 mg. /kg. De P.V.
Estudio radiográfico:	Mediante un protocolo de sedante 0.3 mg./Kg. De P.V. vía I.M. de xilacina y 5 mg./Kg. De P.V. vía I.M. de Clorhidrato de Ketamina.

6.2.- Protocolos de diagnóstico clínico:

Con la finalidad de hacer el diagnóstico de la enfermedad en la población de estudio se aplicaron los siguientes protocolos:

1. Observación de signos clínicos y signo de "Ortolani".
2. Estudios radiológicos.
3. Diagnóstico molecular.

Signos clínicos y Signo de "Ortolani".

Los signos que se determinaron en los perros con DCF son:

1. Claudicación de los miembros pélvicos.
2. Dolor articular que limita el movimiento de la articulación. la observación de signos clínicos, esta se realizó en dinámica viendo al perro caminar y proporcionando unos minutos de ejercicio (subir por una escalera) esta situación acentúa los signos, posteriormente se sometió a un examen físico en una mesa de consulta para palpar la articulación y realizar las pruebas de Ortolani. Después de revisar por palpación la articulación, se sedó o anestesió en su caso al paciente para los siguientes estudios.

Signo de Ortolani.

La prueba fue solamente declarada positiva o negativa al signo de Ortolani (Morgan, 2001).

Radiográficos.

Todos los estudios radiográficos se llevaron a cabo con un equipo 15 mAs y 115 kVs. De marca "General Electric" modelo 11AA 2-3.

Se realizó bajo un protocolo anestésico descrito en el cuadro N° 1.

Se tomaron en la mesa de R.X. en posición de cúbito dorsal y la proyección radiográfica para los dos estudios será ventrodorsal de cadera con las especificaciones de miliamperaje (mAs) y kilovoltaje (kVDC) marcadas para el tamaño de cada uno de los pacientes de acuerdo a las tablas proporcionadas por el fabricante de las pantallas intensificadoras (3M® Small Animal Radiographic Techniques).

Cuadro 2.- Especificaciones de la exposición para cada caso dependiendo del tamaño del paciente (Especificaciones del fabricante de las pantallas intensificadoras, 3M® Small Animal Radiographic Techniques).

Cadera	Cm	kVDC a	Tiempo en
extremidades		15 mAs	segundos
2-3	50	.3	.7
4-5	50	.4	.7
6-7	50	.6	1.0
8-9	56	.6	1.0
10-11	60	.8	1.6 - 1.2
12-13	64	.8	1.6 - 1.2
14-15	68	1.0	2.0
16-17	70	1.0	2.0
18-19	70	1.2	2.4
20-21	76	1.2	2.4

El estudio radiográfico se llevó a cabo bajo las normas, válidas internacionalmente (Instituto Veterinario de Ortopedia y Traumatología 2007).

Ángulo de Norberg:

El Ángulo de Norberg. Se midió con una plantilla el centro geométrico de las cabezas femorales, luego se unen mediante una línea (AB). Del centro de la cabeza femoral, se traza una línea hacia el borde acetabular craneal (AC). El ángulo que forma la línea AC con la AB, es el ángulo de Norberg. En perros normales es igual o superior a 105° (Figura, 2).

Este método es cuantitativo porque se basa en la medida del ángulo formado conectando un punto en el centro de la cabeza femoral con el borde acetabular superior. Las caderas entonces se anotan como el número de grados en el ángulo formado. Por ejemplo, las cuentas se extienden entre 55 a 115 grados con las cuentas del extremo inferior indicativas de mayor laxitud de la cadera (Thibaut, *et al.*, 2005; Instituto Veterinario de Ortopedia y Traumatología 2007).

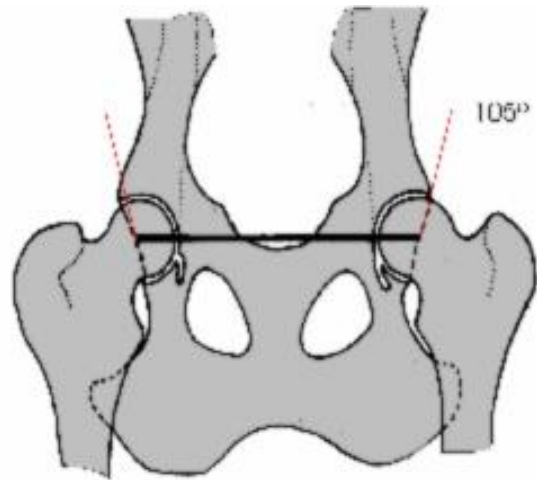


Figura. 9.- Muestra el ángulo formado en el cruce de las líneas AB y AC (Instituto Veterinario de Ortopedia y Traumatología 2007).

6.3 Diagnóstico molecular.

Obtención de muestras sanguíneas.

Se tomaron muestras de sangre individual de cada uno de los 43 perros para la obtención de ADN sanguíneo, estas muestras se obtuvieron de la vena cefálica o de la vena safena mediante la técnica de punción con aguja estéril y tubo vacutainer (con anticoagulante EDTA 0.5 M), previa desinfección de la zona con cloruro de benzalcónio (1:10). Las muestras se conservaron en refrigeración de 2° - 6° C. hasta su procesamiento en el laboratorio que en ninguno de los casos excedió las 36 hrs.

Extracción y purificación de ADN:

La extracción de ADN genómico, fue a partir de sangre con EDTA, por el método de "precipitación salina", descrito por Sambrook y Rusell (2001), a partir de glóbulos blancos (leucocitos) de muestras sanguíneas individuales de los perros incluidos en el estudio. La integridad del ADN se verificó por electroforesis en gel de agarosa 1% en TBE 1X pH 8.0 (44.5mM Tris-HCl, pH 8.0; 44.5 mM ácido bórico; 1mM EDTA) teñido con Bromuro de Etidio [0.5 mg/ml], se utilizó un marcador de peso molecular alto ADN- λ , (IBT-UNAM[®]), aplicando un voltaje de 100 Volts durante 40 minutos. Para

visualizar el ADN, el gel se examinó en un Documentador de geles con Transiluminador de Luz Ultravioleta (Ultra-Lum Spectroline® -312 nm).

Amplificación del ADN por Polimorfismo de ADN Amplificado al Azar Reacción en Cadena de la Polimerasa (RAPD-PCR por sus siglas en inglés).

Los primers o iniciadores fueron obtenidos comercialmente (IDT®). El contenido de las bases GC del oligonucleotido de entre el 60 y 70% del total de pb.

Cuadro 3 .- Secuencias de las bases de cada microsatélite propuesto por (Wang, *et.al.*,1999)

OLIGONUCLEOTIDO	SECUENCIA DE LAS BASES
R37	GAGTCACTCG
R55	CGCATTCCGC
OPW9	GTGACCGAGT
R105	GCACCGAACG

La mezcla de PCR fue en un volumen final de 50 µl conteniendo lo siguiente: ADN genómico 200 ng solución tampón para PCR MgCl₂ 1X 1mM, 0.1 mM de cada dNTP, 0.5 Unidades de *Taq* polimerasa y 0.4 µM de cada microsatélite. La reacción de PCR se llevó a un termociclador MiniOpticon (Bio-Rad®), se utilizó el protocolo de reacción propuesto para los cuatro marcadores por Wang *et al.* (1999).

Cuadro 4.- Protocolo de amplificación por PCR, de los microsatélites R37, R55, R105 y OPW09 (Wang, *et.al.*, 1999).

	Temperatura (°C)	Tiempo
Desnaturalización	94	3 minutos
	94	2 minutos
Amplificación 2 ciclos	33	1 minuto
	72	2 minuto
	94	1 minuto
Amplificación 41 ciclos	33	1 minuto
	72	2 minuto
Extensión	72	7 minutos

El análisis de la amplificación de cada microsatélite, se realizó por electroforesis en gel de agarosa al 1.5% en TBE 1X pH 8.0 (44.5mM Tris-HCl, pH 8.0; 44.5 mM ácido bórico; 1mM EDTA) teñido con Bromuro de Etidio [0.5 mg/ml], 50 pb DNA Promega[®], sometido a 80 Volts durante 1.5 horas en solución tampón de corrida TBE 1X.

La verificación de la amplificación de cada microstélite se realizó al observar los geles de la electroforesis de cada microsatélite en el documentador automático de imágenes Gene-Cam, Spectronic[®], con Transiluminador de Luz Ultravioleta (Ultra-Lum Spectroline[®] -312 nm).

Análisis de resultados RFLP.

Se realizó el análisis estadístico usando datos del estudio sobre la población de perros analizados con los marcadores mirosatélites mediante el cálculo de parámetros de la variación. Los parámetros más comunes derivados de los datos de genotipos son el cálculo de frecuencias alélicas y de la heterocigosidad.

Las frecuencias alélicas se obtuvieron desde el cociente resultante de dividir el número de alelos iguales en una población entre el número total de alelos. El cálculo de las frecuencias se realizó por recuento directo de los alelos frecuentes, asumiendo que la observación de un solo alelo se corresponde con la condición de homocigosis.

Para la heterocigosidad, se acepta generalmente que un locus es polimórfico cuando el alelo más común tiene una frecuencia inferior a 0.95. Una medida de la variación genética es la proporción de loci polimórficos o simplemente polimorfismo en una población. La mejor valoración de la variación genética es la heterocigosidad de la población medida como la frecuencia media de individuos heterocigotos por locus (Lacadena, 1981).

La heterocigosidad se presenta como la frecuencia media de individuos heterocigotos por locus. Se muestra el resultado de dos tipos de heterocigosidad, la heterocigosidad observada (H_o), que es la proporción de individuos heterocigotos observados en una muestra de la población y la heterocigosidad esperada (H_e), se refiere a la diversidad genética de la población analizada.

6.4 Análisis estadístico

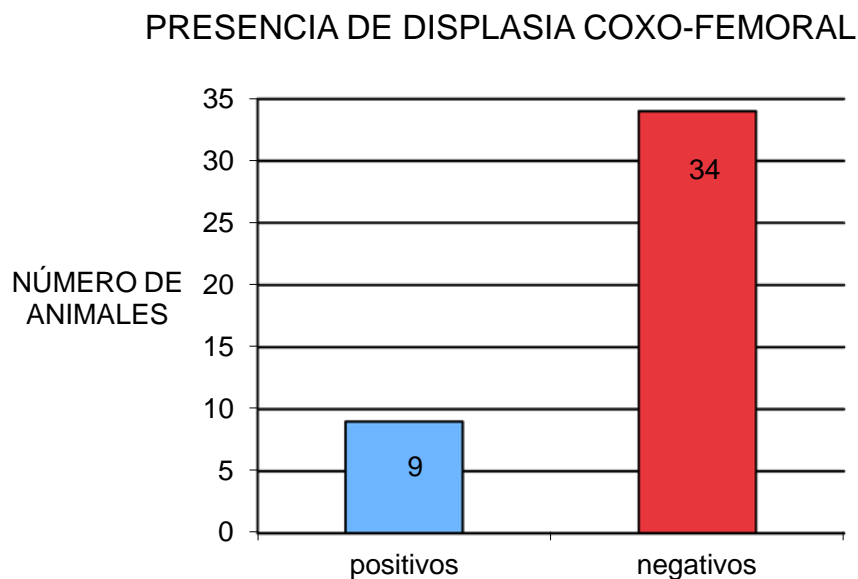
Se utilizó el programa STATISTICA v 10.0 para Windows StatSoft, Inc. (2010), para todos los análisis estadísticos. Utilizando el módulo de estadística descriptiva en tablas de múltiple respuesta para conocer las frecuencias de las variables analizadas; para conocer la correlación entre las distintas variables de respuesta, se utilizó el

módulo de no-paramétrica para realizar la correlación de Spermán y así obtener los valores de relación entre ellas. Por último, con las frecuencias de cada una de las variables analizadas, se realizó un análisis de doble entrada en una tabla de contingencia 2X2 denominado análisis de McNemar, los análisis se realizaron con un nivel de significancia <0.05 . Las figuras fueron realizadas con el software STATISTICA v 10.0.

Para efecto de estandarización de las variables se agruparon las razas de perros de acuerdo al criterio propuesto por Megnin (1896) en molosoides y lupoides. Así como dos grupos en cuanto al peso que serían: de 17 a 25 Kg. (1) y de 26 kg. En adelante (2). Machos y hembras respectivamente y para las edades dos grupos que corresponde el primero a jóvenes de 1 a 4 años de edad y adultos de 4 años en adelante.

7.- RESULTADOS:

Los resultados de la aplicación de los protocolos clínicos así como de los radiográficos mediante el análisis del ángulo de "Norberg" en las proyecciones ventrodorsales de los 43 perros permitieron detectar un total de 9 animales positivos a la Displasia coxo-femoral DCF y 34 individuos cuya cadera no presentó el padecimiento haciendo un total de 21% de animales enfermos, gráfica 1.



Gráfica 1.- Perros que resultaron positivos a las pruebas clínicas para DCF.

En la figura 10 se presenta la imagen de electroforesis del ADN correspondiente a perros de este trabajo, que por sus características electroforéticas reunió las características para la amplificación de los microsatélites.

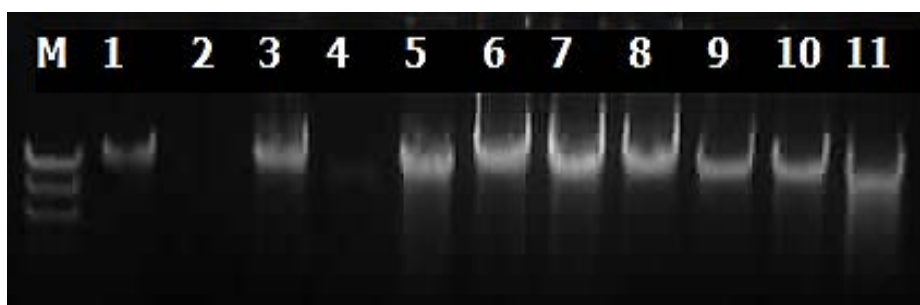


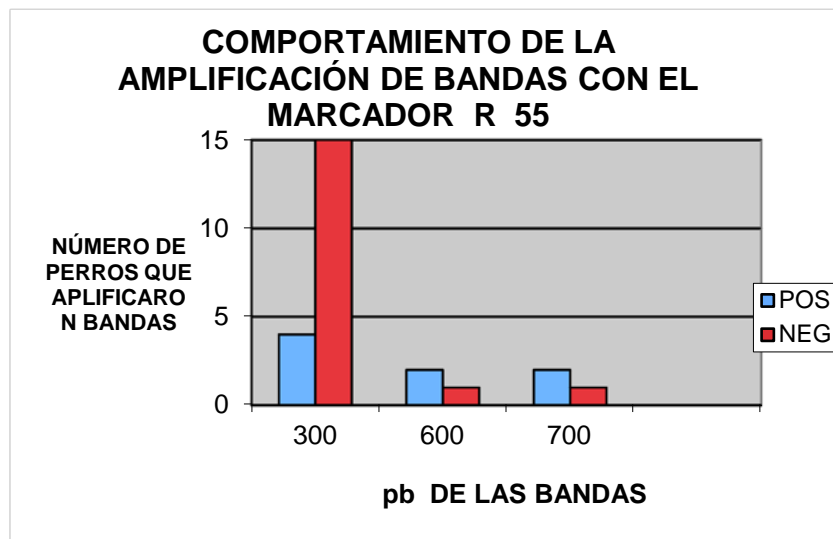
Figura 10. Electroforesis de ADN en Agarosa 1% teñido con bromuro de etidio [0.5 mg/mL]. Carril M: Marcador de peso molecular DNA λ -Hind III; Carril 1, 3-11, ADN de los perros analizados; carril 2 y 4, ADN degradado.

Por lo que respecta a la amplificación de los microsatélites, se observó que no en todos los animales en el grupo de trabajo amplificaron regiones al utilizar los marcadores R37, R55, OPW9, y R105.

Con el marcador R55 se encontraron bandas de 300, 600 y 700 pb, figura 2. En los animales positivos a DCF se observaron dos casos de amplificación de la bandas de 300 pb y dos casos de bandas de 300, 600 y 700 pb. Por lo que 5 perros positivos no amplificaron ninguna banda con este iniciador, gráfica 2. En los perros negativos, se encontró un caso de amplificación de dos bandas 600 y 700 pb, mientras que en quince animales si apareció la banda de 300 pb y no se asoció específicamente a la enfermedad.



Figura 11.- Electroforesis del marcador R55 en Agarosa 1.5 % teñido con bromuro de etidio [0.5 mg/mL]. Carril M: Marcador de peso molecular 50 pb DNA Promega®; Carril 1 y 3 ADN degradado, 2, 4-11, fragmentos amplificados de 700, 600 y 300 pb.



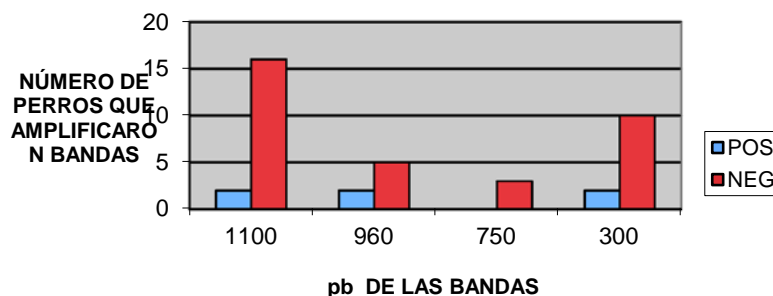
Gráfica 2 Presencia de fragmentos de diferentes pares de bases (pb) del marcador R55 en perros positivos y negativos a DCF.

Con relación al marcador OPW9 se encontró que en los nueve perros positivos a DCF se amplificaron en tres animales fragmentos de 1100 y 300 pb, uno con 960, y 300 pb y uno con 1100 y 960 pb, figura 3. En los perros negativos a DCF el fragmento de 1100 pb amplificó en todos los casos. Los fragmentos amplificadas que más se presentaron en seis perros, 1100, 960, 750, y 300 pb. Se encontró en tres perros, dos de 1100, 960 y 300 pb y cinco con 1100 y 300 pb, gráfica 3. Destaca que el fragmento de 750 pb no aparezca en los perros positivos a la enfermedad, lo que podría interpretarse como una mutación en estos individuos que inhibió la amplificación de este marcador.



Figura 12.- Electroforesis del marcador OPW09 en Agarosa 1.5 % teñido con bromuro de etidio [0.5 mg/mL]. Carril M: Marcador 50 pb DNA Promega®; Carril 1 y 3 ADN degradado, 2, 4-11, fragmentos amplificados de 1100, 960 y 300 pb.

COMPORTAMIENTO DE LA AMPLIFICACIÓN DE BANDAS CON EL MARCADOR OPW 9



Gráfica 3. Presencia de fragmentos de diferentes pares de bases (pb) del marcador OPW09 en perros positivos y negativos a DCF.

Con el marcador R37 se encontró en los casos positivos a DCF, a tres animales que mostraron amplificación de fragmentos de 1000, 500 y 200 pb, figura 4. Dos perros con bandas de 500 y 200 pb. Y un perro en el que solo amplificó la banda de 1000 pb. En los casos negativos a DCF se encontraron seis perros que amplificaron 1000, 500 y 200 pb. Un animal con dos bandas, una de 500 y otra de 200 pb. Y siete perros en los que solamente amplificó una banda de 1000 pb, gráfica 4. Este resultado permite suponer que el marcador R37, no resulta informativo para el diagnóstico de DCF, ya que su amplificación no discrimina entre animales sanos de enfermos.

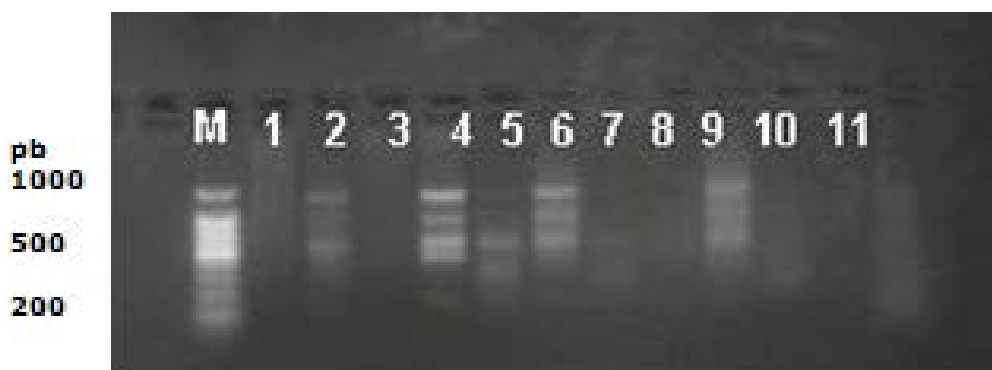
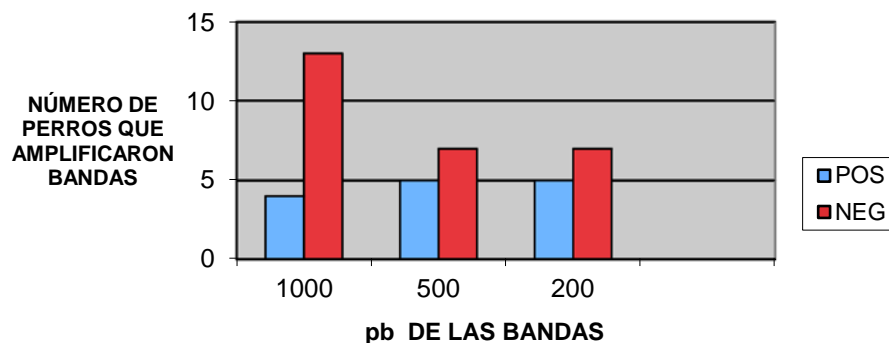


Figura 13.- Electroforesis del marcador R37 en Agarosa 1.5 % teñido con bromuro de etidio [0.5 mg/mL]. Carril M: Marcador 50 pb DNA Promega®; Carril 1, 3, 7,8, 10 y 11 ADN degradado, 2, 4, 5, 6, 9, fragmentos amplificados de 1000, 500 y 200 pb.

COMPORTAMIENTO DE LA AMPLIFICACIÓN DE BANDAS CON EL MARCADOR R 37

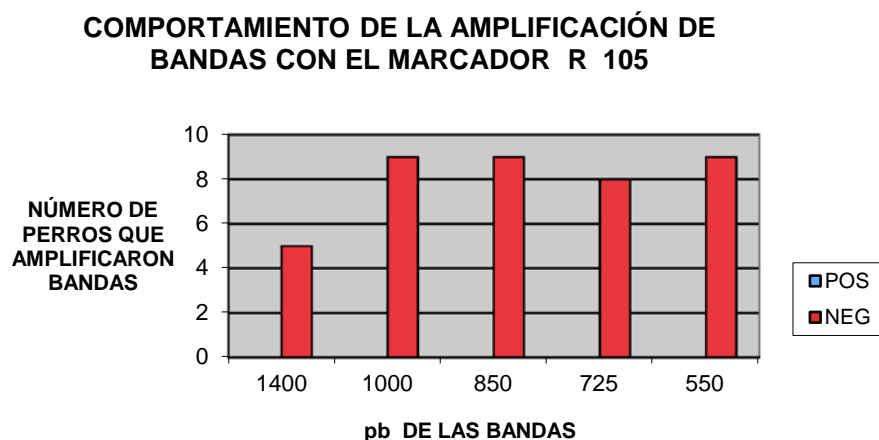


Gráfica 4. Presencia de fragmentos de diferentes pares de bases (pb) del marcador R37 en perros positivos y negativos a DCF.

Por lo que se refiere al marcador R105 se observó que en los animales positivos a DCF no amplificó ninguna banda mientras que en los perros negativos a DCF encontramos tres perros que presentaron bandas de 1400, 1000, 850 725, y 550 pb, figura 5. Mientras que tres animales amplificaron 1000, 850, 725 y 550 pb. Un perro presentó bandas de 1400, 1000, 850 y 725 pb. Un perro de 1400 y 1000 pb. Un perro de 1000, 850, y 550 pb. Y otro perro con bandas de 850, 725 y 550 pb, gráfica 5.



Figura. 14.- Electroforesis del marcador R105 en Agarosa 1.5 % teñido con bromuro de etidio [0.5 mg/mL]. Carril M: Marcador 50 pb DNA Promega®; Carril 1, 3, ADN degradado, 2, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 fragmentos amplificados de 1400, 1000, 850 y 725 pb.



Gráfica 5. Presencia de fragmentos de diferentes pares de bases (pb) del marcador R105 en perros positivos y negativos a DCF.

Con relación al empleo de los marcadores moleculares, la Tabla 1 muestra que los cuatro microsatélites amplificaron en los individuos analizados y se detectaron un total de 15 alelos con un promedio de 3.75 alelos por los cuatro microsatélites, Wang *et al.* (1999), encontró con los mismos marcadores valores menores con 9 bandas en total y una media de 2.5; sin embargo, Chomdej *et al.* (2014), encontró con estos mismo marcadores, 21 bandas amplificadas y una media de 5.25.

Cuadro 5.- Distribución de las variantes alélicas observadas, alelos en pares de bases y frecuencias alélicas para los 4 microsatélites ensayados en 43 perros de razas diversas.

Locus	Secuencia 5' – 3'	Número de Alelos/ <i>locus</i>	Alelos pb	Frecuencias Alélicas
R37	GAGTCACTCG	3	1000	0.53
			500	0.37
			200	0.37
R55	CGCATTCCGC	3	700	0.23
			600	0.07
			300	0.53
R105	GTGACCGAGT	5	1400	0.19
			1000	0.40
			850	0.26
			725	0.19
			550	0.28
OPW09	GCACCGAACG	4	1100	0.42
			960	0.16
			750	0.07
			300	0.3
Total de Alelos		15		
\bar{x} de Alelos		3.75		

Con relación al estudio sobre la distribución de las frecuencias fue posible observar que la frecuencia de homocigotos por cada microsatélite presentó resultados de intermedios a elevados (0.53 – 0.93), por lo que no se considera que haya una distribución homogénea de frecuencias en los individuos analizados, ya que sólo R37 mostró valores intermedios entre homocigotos y heterocigotos, en contraste con R55

que presentó la mayor frecuencia de Homocigotos (0.93) vs Heterocigotos (0.07) (cuadro1).

Con el propósito de observar posibles diferencias en los cálculos de heterocigosidad como resultado en la variación en el número de individuos y microsatélites genotipificados, se realizaron análisis que incluyen los valores de heterocigosidad para las diferentes combinaciones consideradas en cada uno de los animales del estudio. Las pruebas no paramétricas no muestran diferencias significativas para las comparaciones realizadas ($p=0,05$). En el análisis por la Chi cuadrada con un 95% de intervalo de confianza y 1 grado de libertad, ninguno de los microsatélites se relacionó significativamente a la enfermedad.

Cuadro 6. Parámetros genéticos calculados a partir del análisis de 4 *loci* microsatélites, Heterocigosidad observada y esperada y desviaciones del equilibrio Hardy-Weinberg por Chi cuadrada.

		R37	R55	R105	OPW09
HOM	Ho	23	40	28	26
	Frecuencia	0.53	0.93	0.65	0.60
	He	28	40	31	29
HET	Ho	20	3	15	17
	Frecuencia	0.47	0.07	0.35	0.40
	He	15	3	12	14
		43	43	43	43
χ^2		0.0469	0.8126	0.1659	0.1061

HOM = Homocigoto; HET = Heterocigoto; Ho = Heterocigosidad observada;

He = Heterocigosidad esperada; χ^2 = **Chi cuadrada**

En el Equilibrio de Hardy-Weinber al examinar los cuatro microsatélites en conjunto ninguno presentó una desviación significativa del equilibrio de Hardy-Weinberg.

El cuadro 7 muestra los resultados de la prueba de correlación de Sperman (r^2), entre las variables estudiadas con relación a un diagnóstico positivo o negativo de DFC en los perros considerados para el estudio, donde es posible distinguir que las variables Raza y Peso en Kg, $r^2 = 0,42$ y $0,34$, respectivamente, muestran una correlación significativa con la manifestación clínica de la enfermedad; mientras que el

microsatélite R55 muestra una correlación significativa (0,30), en los perros considerados sanos en las pruebas clínicas.

Cuadro 7. Correlación de Spearman (r^2) entre indicadores paraclínicos de perros susceptibles a desarrollar DCF y algunos marcadores moleculares asociados.

	Raza	Edad	Sexo	Peso	DCF	Marcadores Moleculares		
						R37	R55	R105
Raza	1.000000							
Edad	-0.084592	1.000000						
Sexo	0.034570	-0.146999	1.000000					
Peso	-0.055329	-0.057643	0.004415	1.000000				
DFC	0.421553	0.026948	0.026948	-0.342663	1.000000			
R37	-0.214651	-0.153855	-0.153855	0.078603	0.021323	1.000000		
R55	-0.052068	0.047336	0.047336	0.243670	-0.307894	-0.072357	1.000000	
R105	-0.043735	-0.170216	-0.170216	0.061696	0.136682	0.100103	-0.200446	1.000000
OPW9	0.421553	0.026948	0.026948	0.336344	-0.168585	0.485684	-0.034737	0.206564

DFC = Displasia Coxo Femoral.

Análisis de los resultados de asociación

El cuadro 8 muestra los resultados de Asociación entre algunas categorías paraclínicas y las obtenidas utilizando marcadores moleculares, relacionadas al diagnóstico sano/enfermo de Displacia Coxo Femoral en perros.

Cuadro 8.- Asociación entre algunas categorías paraclínicas y las obtenidas utilizando marcadores moleculares, relacionadas al diagnóstico sano/enfermo de DCF en perros.

Categoría	Variable	N	Sanos	Enfermos
Raza	Molosoides	28 (65%)	22	6
	Lupoides	15 (35%)*	12*	3
Edad	Jóvenes	29 (67%)	24	5
	Adultos	14 (33%)*	10*	4
Sexo	Machos	18 (42%)	14	4
	Hembras	25 (58%)	20*	5
R55	Homocigotos	40 (93%)	33*	7
	Heterocigotos	3 (7%)	34**	9*
R37	Homocigotos	20 (47%)	16	4*
	Heterocigotos	23 (53%)	18*	5
R105	Homocigotos	28 (65%)	21	7
	Heterocigotos	15 (35%)	13**	2
OPW9	Homocigotos	17 (40%)	12	5
	Heterocigotos	26 (60%)	22*	4

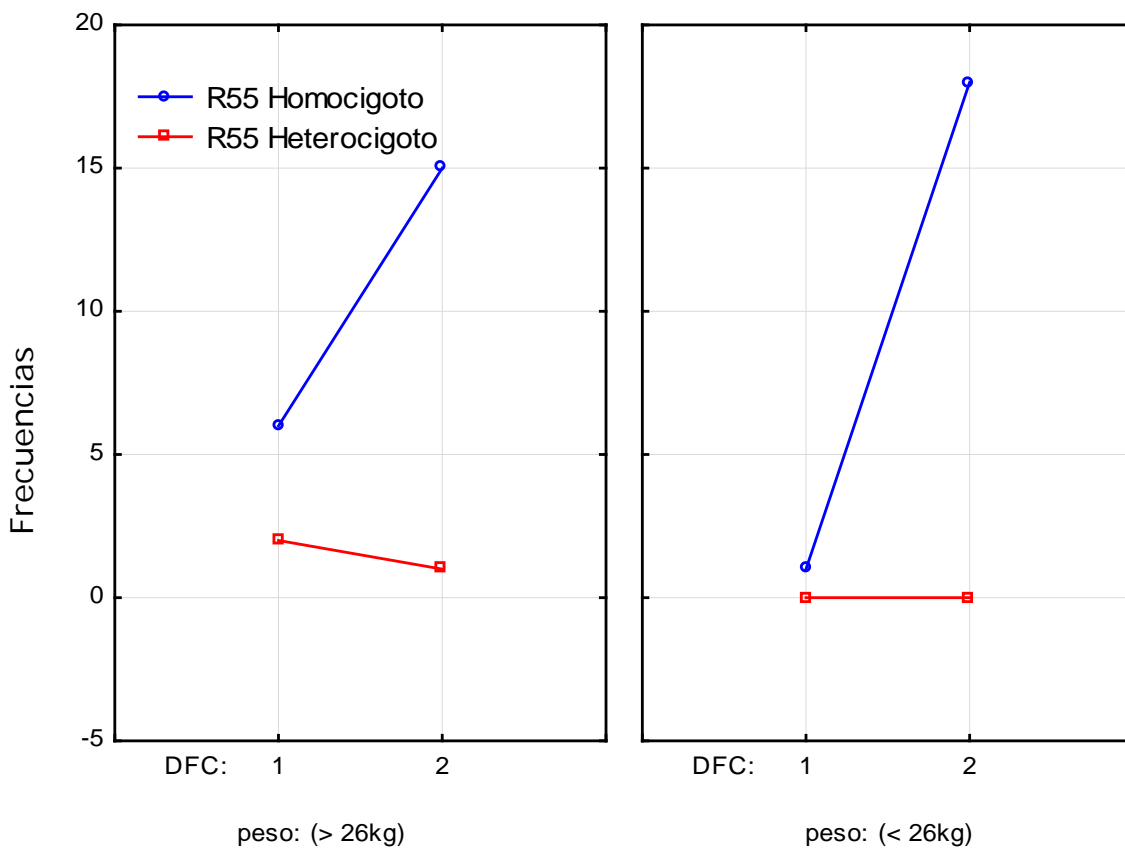
*P < 0.05 **P < 0.01

Al analizar los resultados de la prueba de contingencia 2 x 2, por el método McNemar, Chi –cuadrada, fue posible reconocer entre la población estudiada a los perros hembras clínicamente sanos a DFC (P < 0.022), de la misma manera el

marcador R 37, permitió distinguir a individuos hembras heterocigotas clínicamente sanas a DFC, de acuerdo con los resultados del análisis de McNemar ($P < 0.056$) y Chi – cuadrada ($P < 0.29$).

De la misma manera, la amplificación de los marcadores moleculares R105, OPW09 y R55 de perros heterocigotos clínicamente sanos mostraron una significancia estadística ($P < 0.0002$, $P < 0.0021$ y $P < 0.0021$), respectivamente.

Además, resultados obtenidos de los análisis estadísticos señalados, a partir de valores de frecuencias sugieren, que la variable Peso (Kg), en las muestras de los individuos homocigotos que amplificaron el marcador molecular R55, el valor de estas frecuencias estarían relacionadas con aquellos casos clínicos de DCF diagnosticados como sanos en perros con un peso superior a 25 Kg (Figura 1).

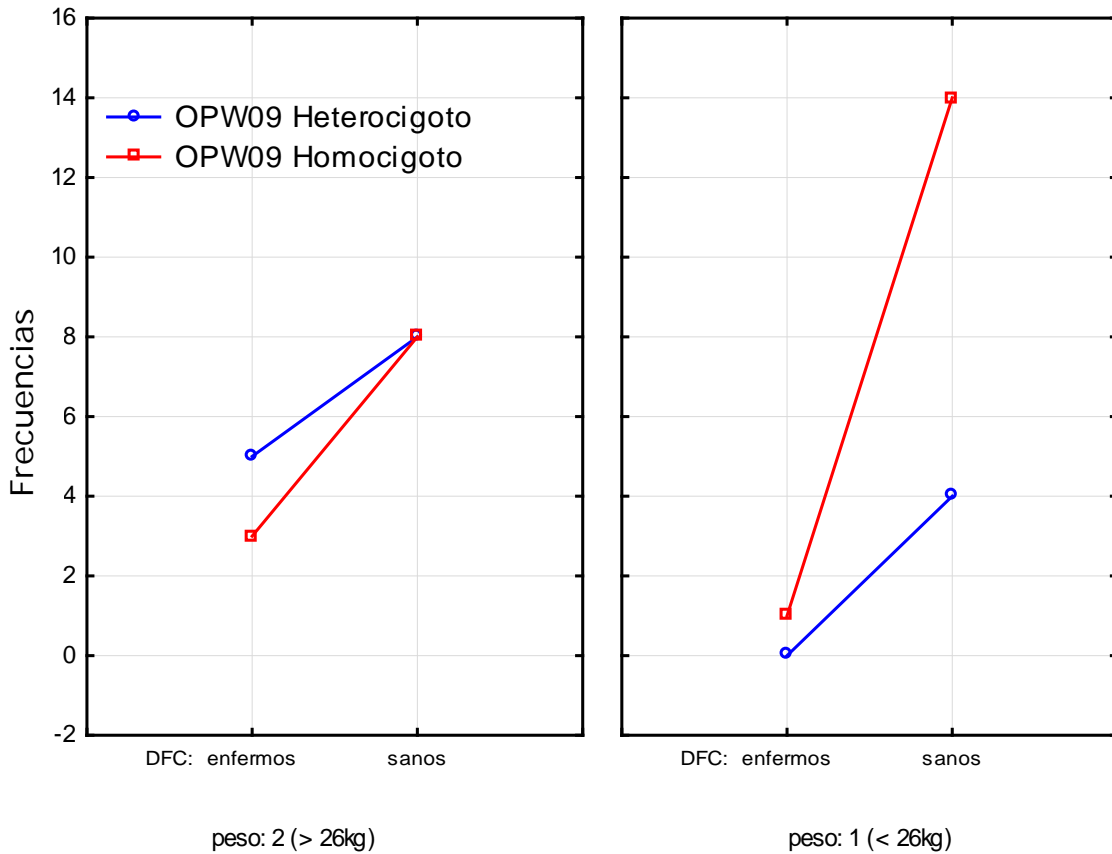


Gráfica N° 6. Influencia homocigótica del marcador molecular R55 en perros clínicamente sanos a DFC, con peso > 25 Kg.

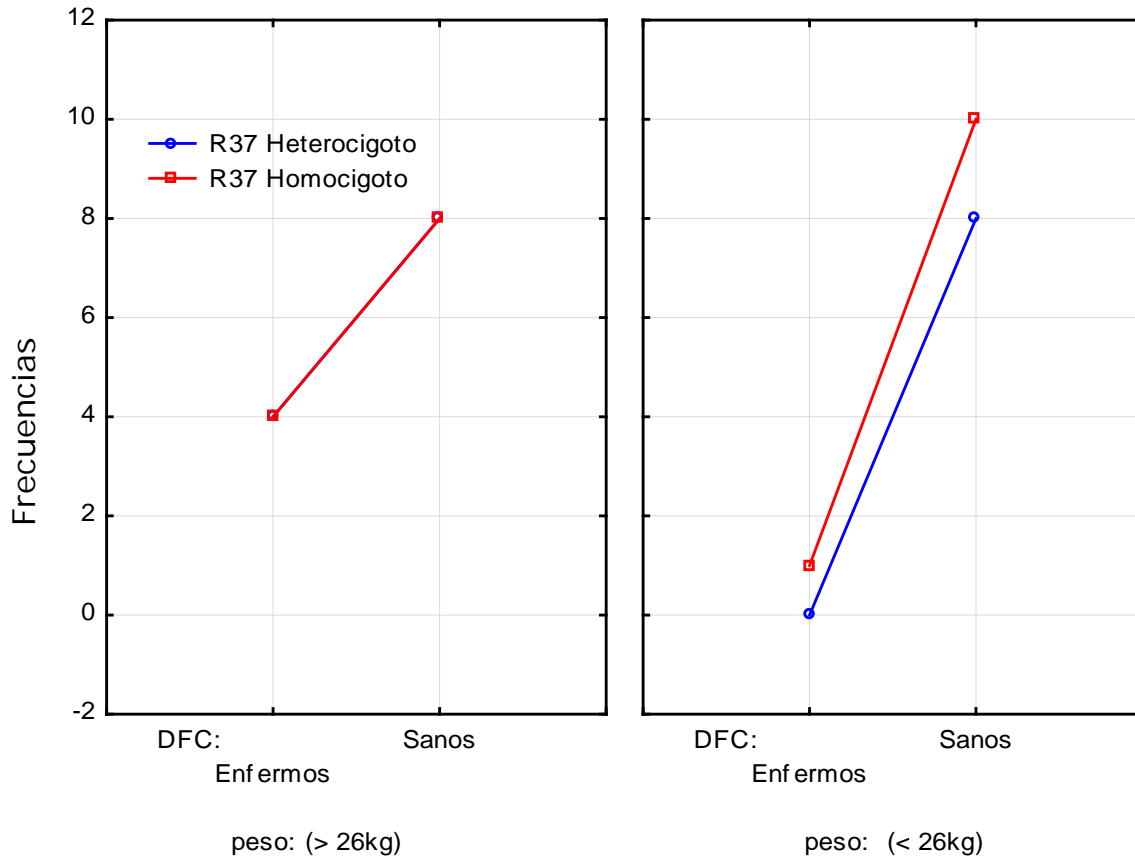
1 = Homocigoto; 2= Heterocigoto

Por el contrario, para los marcadores moleculares R 37, R 105 y OPW09, la influencia homocigótica del peso entre individuos clínicamente sanos a DFC se asoció

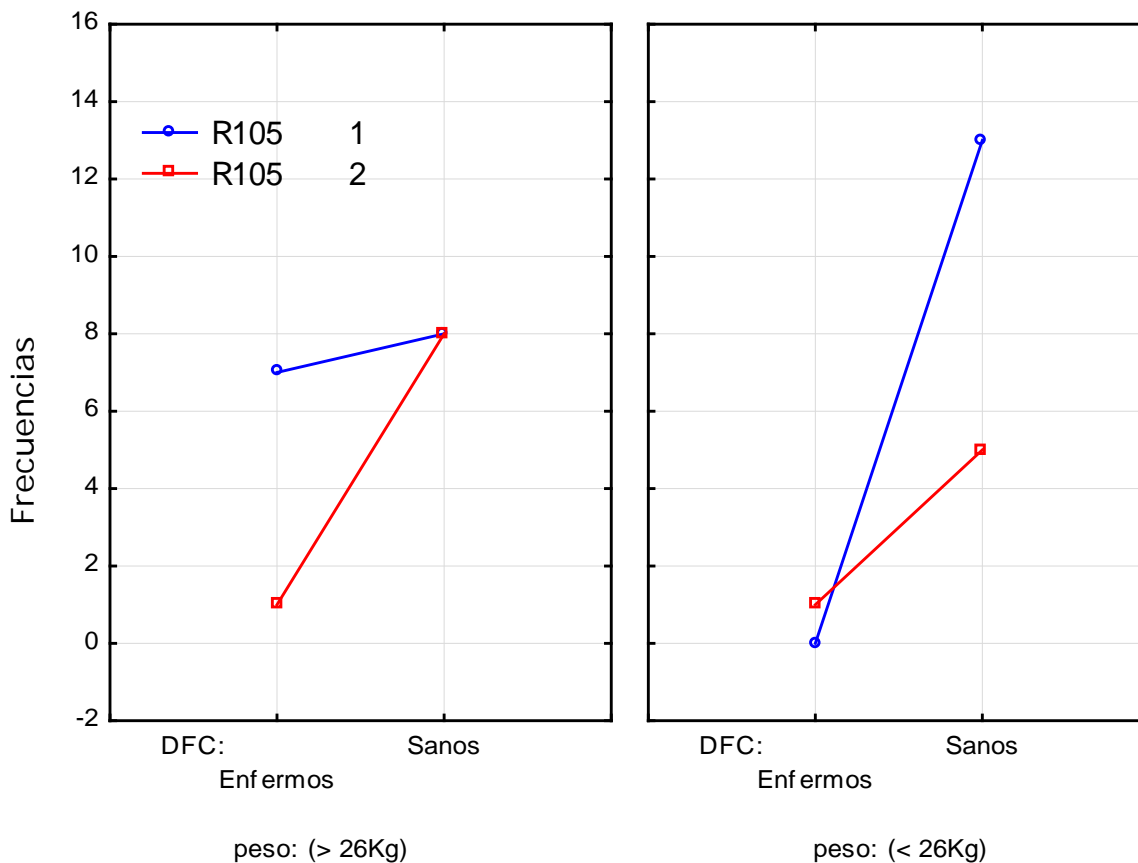
con un peso < 25 Kg, condición diferente a la expresión del marcador R55, aunque dichas frecuencias se manifiesta también en individuos diagnosticados como sanos (Gráfica N° 6, 7, 8, 9 y 10).



Gráfica N° 7. Influencia homocigótica del marcador molecular R55 en los perros clínicamente sanos a DCF. con peso < 25 kg.



Gráfica N° 8. Influencia homocigótica del marcador molecular R37 en los perros clínicamente sanos a DCF. con peso < 26 kg.



Gráfica 9. Influencia homocigótica del marcador molecular R105 en los perros clínicamente sanos a DFC. con peso < 26 kg.

En tanto que para la variable Sexo, luego de ser evaluados por las pruebas de Chi – cuadrada, ($P < 0.0001$) y Sperman ($P < 0.013$), los marcadores moleculares permiten distinguir a hembras heterocigotas, clínicamente sanas con asociación al marcador molecular R55. En relación a la raza los perros Lupoides sanos, resultaron con una significancia estadística ($P < 0.05$), respecto a la expresión de DFC, de la misma manera los perros adultos sanos resultaron significativos ($P < 0.05$), con respectos al resto de los perros considerados para el estudio. ($P < 0.05$).

8.-Discusión:

La comparación de los fragmentos generados en este trabajo con los obtenidos en otros laboratorios que utilizaron los mismos marcadores y materiales (Wang *et al.*, 1999; Chomdej *et al.* 2014), muestran que en la mayoría de los casos, los patrones de las bandas son consistentes y con escasas diferencias en la estimación del peso molecular de las bandas amplificadas. Ello puede obedecer a que la determinación del tamaño de las bandas es subjetiva, sin embargo la metodología empleada y los reactivos fueron similares, por lo que la lectura de las mismas se considera efectiva y concordante ya que los cuatro marcadores resultaron polimórficos.

De los perros estudiados, 9 animales presentaron signos clínicos de la enfermedad y se encontraron suficientes elementos en los exámenes radiológicos para considerarlos como positivos a la DCF. Con respecto al diagnóstico molecular, los resultados con los cuatro marcadores mostraron polimorfismos tanto internos como externos, tal y como lo reportó Wang *et al.* (1999) y Chomdej *et al.* (2014).

De la amplificación de polimorfismos R37, R55, R105 y OPW09, Wang *et al.* (1999), reporta en tres de los perros de su experimento, que con el marcador R55 ocurre la amplificación de una banda de 1600 pb, mientras que en este trabajo la banda que se amplificó en más casos fue la de 300 pb. Que apareció en quince de los perros negativos, sin embargo, también apareció en dos de los casos de perros positivos, por lo que la amplificación de esta no lo hace excluyente de la enfermedad.

Para el caso del marcador OPW09, en la amplificación de las bandas destaca la aparición de una banda de 1100 pb. Que aparece en quince de los perros negativos, y en dos de los casos positivos. En contraposición con lo afirmado por Wang *et al.* (1999), con este mismo marcador se encontró una banda de 750 pb que solamente amplificó en 5 de los animales de estudio siendo todos ellos machos.

El comportamiento de la amplificación de bandas con el marcador R105 Wang *et al.* (1999), aseguraron que este iniciador fue capaz de identificar a cinco de siete casos positivos a DCF diagnosticados radiográficamente, describen la presencia de bandas de 1000 pb en todos los miembros de la familia, pero de dos intensidades luminosas diferentes de manera que en 3 perros encontró alta intensidad en la banda y estos eran positivos a DCF; por otro lado amplificó bandas del mismo tamaño pero de menor intensidad en 2 perros más que resultaron positivos a DCF. Sin embargo, en este trabajo, no se encontró amplificación de bandas en los animales positivos, lo que podría interpretarse como que la generación de este polimorfismo excluye la displasia.

Sin embargo, los resultados de Chomdej *et al.* (2014), que dirigen el uso de estos cuatro microsatélites al diagnóstico de luxación patelar, padecimiento que reúne las mismas anomalías bioquímicas de la DCF para la presentación de lesiones que inducen a ambas enfermedades, no encontraron asociación con la luxación patelar, estos mismos autores al secuenciar el marcador R105 con el genoma del perro, encontraron que los fragmentos secuenciados corresponden a parte de dos diferentes cromosomas, el X y el 10, lo que explicaría el hallazgo tanto de Wang *et al.* (1999) y en este trabajo, de fragmentos de 1000 pb con intensidad luminosa alta y baja al observar el gel, Wang *et al.* (1999) sugerían que cada una banda por su luminosidad era independiente, pero aunque aparecieron ambas en animales enfermos, no todos los enfermos de su experimento presentaron este fragmento de 1000 pb.

En la asociación tanto de los resultados del análisis clínico y molecular, aunque ninguno de los microsatélites parece ser el marcador potencialmente responsable, Clements *et al.* (2009) y Chomdej *et al.* (2014), sugieren que en el uso de marcadores siempre se debe considerar que estos pueden desempeñar papeles importantes en el control de la patología de la enfermedad, ya que estas secuencias de forma extragénica serían capaces de actuar como promotor, potenciador, o incluso como un gen sin descubrir, que logre afectar la expresión de algunas funciones de la proteína del gen o de su control.

La técnica de RAPDs – PCR utilizada en este trabajo fue capaz de amplificar polimorfismos con los diferentes marcadores utilizados y aun cuando los cuatro marcadores fueron polimórficos, el valor de p y la relación con los animales enfermos y sanos en el cálculo de la Chi cuadrada con un grado de libertad y 95% de intervalos de confianza, ninguno de los fragmentos encontrados se relacionó significativamente a DFC. En este sentido, la hipótesis de que alguna de las regiones amplificadas efectivamente tenga asociación con la presencia de la DCF, ya que el marcador puede comenzar a amplificar en ADN en aquellas zonas no codificables no se cumplió, y es probable que simplemente los microsatélites tomaron regiones que corresponden a cualquier otra característica de los individuos y desde luego no corresponden a la enfermedad.

Existe un específico grupo de enfermedades genéticas cuyos antecedentes son multifactoriales, lo que significa que su transmisión es mediada por efectos o factores del medio ambiente y que esta relación es crucial para el curso clínico de la enfermedad. Esta clase de padecimientos es bien conocida en la genética humana e incluyen el asma, la diabetes, epilepsia, hipertensión y muchas otras.

En el perro hay al menos 2 ejemplos muy importantes que siguen un modelo muy parecido al de estas enfermedades en el humano. La displasia de cadera es una de las más comunes afectando a perros de razas grandes. Debido a su naturaleza multifactorial el coeficiente de heredabilidad (h^2) es el parámetro que mejor demuestra el efecto de la variabilidad genética en el desarrollo de la malformación fenotípica. Este parámetro para la displasia de cadera varía en un rango de (0.11 – 0.68) (Switonski, *et al.*, 2004).

En el estudio de las diferentes expresiones génicas y su posible asociación a la presencia de la DCF Los datos aportados por Todhunter, *et al.*, (2003; 2005) en los que menciona la localización de diversos *locus* de la enfermedad, así como los trabajos de Cicuttini y Spector (1996) y Fernández *et al.* (2007), sobre los complejos mecanismos de transmisión de la misma y el papel que juega el medio ambiente sobre una base genética múltiple (Clemens, *et al.*, 2006; Haila, 2001), da lugar a un aumento en la cantidad de investigaciones en el campo del estudio de los genes candidatos fundamentalmente aquellos relacionados con la síntesis de colágeno y genes de la familia de los transportadores de sulfato (Haila, 2001; Lee, 2007; Bonafé, 2008) así como de la epigenética (Maher, *et al.*, 2008) en donde los cambios fueron definidos por alteraciones genéticas que no producen modificación de las secuencias de ADN que involucren una mutación. Estos procesos están envueltos fundamentalmente en la metilación o acetilización de ADN en donde este es deshabilitado para ser transcrito y consecuentemente no hay expresión génica, tal como afirman Roach y Aigner (2007), que reportaron un incremento en la matrix metaloproteinasas (MMP) asociada a la presentación de osteoartritis y la metilación como la llave promotora de la secuencia de estos procesos en la especie humana. Todavía a la fecha, no se conocen en su totalidad estos mecanismos fisiológicos, razón por la que la tendencia de los investigadores trabajando en enfermedades degenerativas en el ser humano cada día le dan más peso a estos procesos de fisiología y bioquímica celular.

9.-Conclusiones:

Como se ha mencionado a lo largo del trabajo, la DCF es una enfermedad que involucra múltiples genes y factores ambientales. La mayoría de los estudios indican que hay relación con determinados polimorfismos o bien que se encuentran identificados diferentes locus para algunos genes candidatos que tienen relación con la enfermedad.

En el caso de la técnica de microsatélites al azar llevada a cabo en este trabajo muestra que los marcadores utilizados aún habiendo amplificado algunas regiones tienen una modesta o nula influencia en la detección de polimorfismos asociados a la enfermedad ya que no podemos asegurar que estos hallazgos estén relacionados con la DCF para que pueda ser considerada como una prueba concluyente o diagnóstica de la misma en este momento.

Mediante la técnica de RAPDs-PCR utilizando los marcadores referidos no es posible estandarizar un diagnóstico a cualquier edad del animal.

El mejoramiento genético asistido para el caso de los perros deberá desarrollar una herramienta molecular que permita conocer el estado de la base genética

Perspectivas:

El estudio de las enfermedades de carácter genético mediadas por factores ambientales tiene una gran carga de complejidad por lo que el uso de una sola técnica tal vez resulte insuficiente.

Para el caso de utilizar técnicas de RAPDs-PCR llevarlas a cabo en ARN en lugar de ADN para evitar la posibilidad de que el marcador pudiera amplificar regiones no codificables del ADN que resulten de relativo interés mientras que en el ARN todo el material que se llegara a amplificar es codificable.

El estudio de los genes candidatos como el SL26A2, y el COL1 y COL2 que ya sabemos que tienen interacción con el padecimiento y que su conocimiento aporta datos muy interesantes sobre la patogenia del mismo y el conocimiento de los cambios estructurales y fisiológicos que sufre la articulación en el proceso osteoartrósico al presentarse la enfermedad. Es necesario hacer notar que si estudiamos a estos genes sabremos que lo que estamos encontrando tiene relación con el padecimiento.

Por último mencionar la posibilidad de hacer estudios sobre la influencia del medio ambiente y su interacción sobre la base genética de los animales resultando así el gran modelador de la evolución de las especies.

10.-BIBLIOGRAFÍA:

1. Argente, J. (2000). Bases fisiológicas, moleculares, diagnósticas y terapéuticas del crecimiento. *Anales Españoles de pediatría*. Vol. 52, Suplemento 1. pp 34-38
2. Bell, J.S. (2002). Hip Check: In the battle against canine hip dysplasia, identification, treatment, research, and canine care are the weapons of choice. *Australian Shepherd Health and Genetics*.
3. Blis, S.; Todhunter, R.J.; Quaas, R.; Casella, G.; Wu, R.; Lust, G.; Williams, A.J.; Hamilton, S.; Dykes, N.L.; Yeager, A.; Gilbert, R.O.; Burton-Wurster, N.I. Acland, G.M. (2002). Quantitative genetics of traits associated with hip dysplasia in a canine pedigree constructed by mating dysplastic Labrador Retrievers with unaffected Greyhound. *American Journal of Veterinary Research* Vol. 63, N° 7 1029-1035.
4. Bonafé, L.; Hastbacka, J.; De la Chapelle, A.; Belinda, A.; Xavier, C.; Chiesa, C.; Forlino, A.; Superti-Furga, A.; Rossi, A. (2008). A novel mutation in the sulfate transporter gene SLC26A2 (DTDST) specific to the Finnish population causes de la Chapelle dysplasia. *Journal of Medical Genetics*. Vol. 10. 1136 pp 1-13
5. Budras, K.; Salazar, I.; Wolfgang, F. (1989). Atlas de anatomía del perro. Madrid Interamericana Mc Graw-Hill España.
6. Burk, R.L.; Ackerman, N. (1996). *Small Animal Radiology and Ultrasonography a Diagnostic Atlas and Text*. W.B. Saunders Company printed in the United States of America.
7. Burton-Wurster, N.; Matesscu, R.G.; Todhunter, R.J.; Clements, K.M.; Sun, K.; Scarpino, V.; Lust, G. (2005). Genes in Canine Articular Cartilage that Respond to Mechanical Injury: Gene Expression Studies With Affymetrix Canine GeneChip. *Journal of Heredity* Vol. 96 N° 7 821-828.
8. Cañas, F. (2007). Genes candidatos asociados a la osteoporosis. *Actualizaciones en osteología* Vol. 3 – N° 2 pp 90-95
9. Cargill, J.C. (2000). Canine hip dysplasia part. III Sirius dog.com. <http://siriusdog.com/articles/dysplasia-hip-dog-chd-ofa-pennhip-3.htm> Consultado: junio de 2010
10. Cargill, E.J.; Schnabel, R.D. and Murphy, K.E. (2004). Assignment of Canine MSS1 Microsatellite Markers to Chromosomes by Linkage Data. *DNA Sequence*. Vol 15 (3) pp 209-212.
11. Cicutini, F.M. Spector, T.D. (1996). Genetics of osteoarthritis. *Annals of the rheumatic disease*. Vol. 55 pp 665-676.
12. Cervantes, A.P. (2005). Caracterización de la producción y composición láctea en vacas de diferentes genotipos en Veracruz, México. Tesis Doctoral CENSA Universidad Agraria de la Habana Cuba.

13. Clayton, J.D.G. (2001). La articulación de la cadera. En Houlton, J.; Collinson, R. Manual de artrología en pequeños animales. Ediciones impreso en España.pp 269-294.
14. Clements, D.N.; Carter, S.D.; Innes J.F.; Ollier W.E.; Day P.J. (2006). Analysis of normal and osteoarthritic canine cartilage mRNA expression by quantitative polymerase chain reaction. *Arthritis Research Therapy* Vol. 8 N° 6 pp1-9.
15. Clements, D.N.; Short, A.D.; Barnes, A.; Kennedy; L.J.; Ferguson,J.F.; Butterworth, S.J.; Fitzpatrick, N.; Pead,M.; Bennet, D.; Innes J.F.; Carter, S.D.; Ollier, W.E.R. (2010) A Candidate Gene Study of Canine Joint Diseases. *Journal of Heredity*. 101(1): 54-60.
16. Chomdej S., Kuensaen Ch., Pradit W. y Nganvongpanit K. (2014). Detection of DNA Markers in Dogs with Patellar Luxation by High Annealing Temperature - Random Amplified Polymorphic DNA Analysis. *Kafkas Univ Vet Fak Derg.*, 20 (2): 217-222.
17. Donahue, L.R.; Chang, B.; Mohan, S.; Miyakoshi, N.; Wergedal, J.E.; Baylink, D.J.; Hawes, N.L.; Rosen, C.J.; Ward-Bailey, P.; Zheng, Q.; Bronson, N.T.; Johnson, K.R.; Davisson, M.T. (2003). A Missense Mutation in the Mouse Col2a1 Genes Causes Spondyloepiphyseal Dysplasia Congenita, Hearing loss, and retinoschisis. *Journal of bone and mineral research*. Vol. 18 N° 2003 pp 1612-1621.
18. Evans, H.E.; Christensen, G.C. (1979). Miller´s Anatomy of the Dog. W.B. Saunders Company, Philadelphia USA.
19. Fernández, M.M.; Rego, I.; Blanco, J.F. (2007). Genética de la osteoarthritis. *Reumatología Clínica* Vol. 3 N° extra 3 pp 1-8.
20. Fujiki, M; Misumi, K.; Sakamoto, H. (2004). Laxity of Canine Hip Joint in two positions with Computed Tomography. *Journal of Veterinary Medical Science*. Vol. 66 (8) pp 1003.1006.
21. Genome Home Referens.(2015). <http://ghr.nlm.nih.gov/BrowseGenes>
Consultado: 23 Febrero 2015
22. Gil,J.; Gimeno,M.; Laborda,J.; Nuviala,J. (1997). Anatomía del perro. Protocolos de disección. Masson S.A. Barcelona (España)
23. Ginja, M.; Silvestre, A.;Gonzalo-Orden, J.; Ferreira,A. (2010). Diagnosis, Genetic control and Preventive Management of Canine Hip Dysplasia: A Review *The Veterinary Journal* Vol.184 issue 3 pp. 269-276.
24. Gu,W.; Acland,G.M.; Langston,A.A.; Ostrander,E.A.; Aguirre,G.D.; Ray,K. (1998). Identification of a RAPD marker linked to progressive rd-cone degeneration in dogs. *Mammalian Genome* Vol. 9 pp 740-744.
25. Guo, G.; Zhou,Z.; Wang, Z.; Zhao,K.; Lust, G.; Hunter,L.; Friedenbergs,S.; Li,J.; Zhang,Y.; Harris, S.; Jones,P.; Sandler,J. Krotscheck,U.; Todhunter, R.; Zhang,

- Z. (2011). Canine Hip Dysplasia is Predictable by Genotyping. *Osteoarthritis and cartilage*. Vol. 19 issue 4 pp. 420-429.
26. Haila, S.; Hastbacka, J.; Bohling, T.; Karjalainen, M.L.; Kere, J.; Saarialho-Kere, U. (2001). SLC26A2 (Diastrophic Dysplasia Sulfate Transporter) Is Expressed in Developing and Mature Cartilage But Also in Other Tissues and Cell Types. *The journal of Histochemistry and Cytochemistry*, Vol. 49 N° 8 pp973-982.
27. Hara, Y.; Harada, Y.; Fujita, Y.; Taoda, T.; Nezu, Y.; Yamaguchi, S.; Orima, H.; Tagawa, M. (2002). Changes of Hip Joint Congruity alter Triple Pelvic Osteotomy in the Dog With Hip Dysplasia. *Journal of Veterinary Medicine Science*. 64. (10) 933-936.
28. Iniesta, R. ; Guino, E.; Moreno, V. (2005) Análisis Estadístico de polimorfismo genético en estudios epidemiológicos. Servicio de Epidemiología y Registro del Cáncer IDIBELL Instituto Catalan de Oncología; Unidad de Bioestadística, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Barcelona, España.
29. Internacional conferens of animals genetis (1997) (ISAG). 25th. (Tours France)
30. Instituto Veterinario de Ortopedia y Traumatología IVOT - 2015
31. http://www.traumatologiaveterinaria.com/index.php?web=displasia_cad/displasia.php Consultado Febrero 2015
32. Kapatkin, A.S.; Gregor, T.P.; Hearon, K.; Richardson, R.W.; McKelvi, P.J.; Fordyce, H.H.; Smith, G.K. (2004). Comparison of two radiographic techniques for evaluation of hip joint laxity in 10 breeds of dogs. Vol. 224 N° 4 pp 542-546.
33. Lacadena, J.R. 1981. Genética. 3ª Edición. A.G.E.S.A. Madrid.
34. Leanne K. (2005). Genetics Analysis of Canine Hip Dysplasia. A dissertation in partial fulfillment of the requirements for the degree of Doctor of Philosophy. Texas A & M University.
35. Lee, S.A.; Lee, S.G.; Cho, K.O.; Hyun, Ch. (2007). Isolation, characterization and molecular screening of canine SLC26A2 (sulphate transporter) in German Shepherd dogs with hip dysplasia. *Journal of genetics*. Vol. 86, N° 3 pp285-288.
36. Lust, R.; Todhunter, R.J.; Erb, H.N.; Dykes, N.L.; Williams, A.J.; Burton-Wuster, N.I.; Farese, J.P. (2001) Comparison of three radiographic methods for diagnosis of hip dysplasia in eight-month-old dogs. *Journal of Veterinary Medical Association* Vol. 219 N° 9 pp 1242-1246.
37. Maher S.A.; Hidaka Ch.; Matthew E.; (2008) What's New in Orthopedic Research. *The journal of bone and joint surgery*. Vol 90-A Number 8 pp 1799-1808
38. Maxwell, R.V. Degenerative joint disease review.- I XXIX Congreso annual AMMVEE 2007 " Carlos Guzmán Clark" Veracruz, Ver. Memorias.

39. Megnin. P. (1896). 1st Standard "Caractère des crais dogues. en: Le dogue de Bordeaux.
40. Merk, Sharp and Dohme (2005) de España S.A. Copyright Madrid España.
41. Montaldo, H.H.; Meza-Herrera, C.A. (1998) Use of molecular markers and major genes in the genetic improvement of livestock. *Electronic Journal of Biotechnology. Universidad Católica de Valparaíso Chile*. Vol. 1 N°2
42. Morgan, J.P.; Wind, A.; Davidson, A.P. (1999) Bone dysplasias in the Labrador Retriever: a radiographic study. *Journal of the American Animal Hospital Association*, Vol. 35 N° 4 pp 332-340.
43. Morgan, J.P.; Wind, A.; Davidson, A. (2000) Displasia de cadera. En Enfermedades articulares y óseas hereditarias del perro Inter-médica XXI-2001 Buenos Aires, Republica de Argentina. Pp 109-208.
44. National Center for Biotechnology Information. NCBI <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> Consultado febrero 2015
45. Nei, M. 1987. F-statistics and analysis of gene diversity in subdivided populations. *Ann. Hum. Genet.* 41: 225-233.
46. Ohlerth, S.; Lang, J.; Busato, A; Gaillard, M. (2001) Estimation of genetic population variables for six radiographic criteria of hip dysplasia in a colony of Labrador Retriever, *American Journal of Veterinary Research* Vol. 62 N° 6 pp 846-852.
47. Olmstead, M.L. (2000) Trastornos de la articulación coxofemoral. En Birchard, S. J.; Sherding, R. G. Manual Clínico de Procedimientos en Pequeñas Especies. McGraw Hill – Interamericana Vol. II 2° Edición PP 1323-1331.
48. Ostrander, E.A.; Lindblad-Toh, K.; Lander, E.S. (2005) Sequencing the Genome of the Dog *Canis familiaris*.
49. Peña Y. J. CINVESTAV .- <http://www.cimat.mx/~gil/tcj/2001/biologia/intro/> Consultado mayo 2009
50. Portilla, M.E. (2007) Tesis de maestría Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Veracruzana.
51. Power, M.; Karbe, G.; McKelvie, P.; Culp, W.; Fordyce, H.; Smith, G. (2010). Evaluation of the Relationship Between Orthopedic Foundation for Animals Hip Joint Scores and PennHip Distraction index values in dogs. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 1;237 (5):532-41.
52. Puerto, D.A.; Smith, G.K.; Gregor, T.P.; Lafond, E.; Conzemius, M.G.; Cabell, L.W.; McKelvie, P.J. (1999) Relationships between results of the Ortolani method of hip joint palpation and distraction index, Norberg angle, and hip score in dogs. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, vol. 214, N° 4 pp 497-501.

53. Roush J.K. (2004) Enfermedades de las articulaciones y los ligamentos. En Morgan, R.V.; Brighths, R.M.; Swartout, M.S. Clínica de Pequeños Animales, Elsevier Imprint, cuarta edición, pp 773-789.
54. Rubini, M.; Cavallaro, A.; Calzolari, E.; Bighetti, G.; Sollazzo, V. (2008) Exclusion of COL2A1 and VDR as Developmental Dysplasia of the hip genes. *Clinical Orthopedics and related Research*, Vol. 466 N° 4 pp 878-883.
55. Runge, J.; Kelly, S.; Gregor, T.; Kotwal, S.; Smith, G. (2010). Distraction Index as a Risk Factor for Osteoarthritis Associated With Hip Dysplasia in four Large Dog Breeds. *J. Small Animals Practice*. May 51 (5) 264-9.
56. Salg, K.G.; Temwichtir, J.; Imhols, S.; Hazenwinkel, H.A.W.; Leegwater, P.A.J. (2006) Assessment of collagen genes involved in fragmented medial coronoid process development in labrador retrievers as determined by affect sibling-pair análisis. *American Journal Veterinarian Research*, Vol 67 N° 10 pp 1713-1718.
57. San Roman, F. (2000) El cartílago Articular. Memoria del Iams Nutrition Symposium, Chicago, USA. 11 al 14 de mayo del 2000.
58. Sánchez-Valverde, M .A. (1997) Traumatología y ortopedia de pequeños animales, McGraw Hill Interamericana, Madrid España.
59. Shadt, E.E. (2006) Novel Integrative genomics strategies to identify genes for complex trait. *Animal Genetics*, Vol. 37 pp 18.
60. Semyenova, S.K.; Illarionova, N.A.; Vasil´ev, V.A.; Shubkina, A.V.; and Ryskov A.P. (2002) Genetics Analysis and Estimation of Genetic Diversity in East European Breeds of Windhound (Canis familiaris L) Based on the Data of Genomic Studies Using RAPD Markers. *Russian Journal of Genetic*, Vol. 38 N° 6 pp 842-852.
61. Siritwadee, C.; Chakkrapong, K.; Waranee, P.; Korakot, N. (2014) Detection of DNA Markers in Dogs with Patellar Luxation by High Anneling Temperature – Random Amplified Polymorphic DNA Analysis. *Kafkas Univ. Vet.Fak. Derg.* 20 (2) 217 – 222.
62. Smith, G.K. (1997) Advances in diagnosing canine hip dysplasia. *Journal of American Veterinary Medical Association*. Vol. 15;210 (10): 1417-8
63. Smith, G.K.; Mayhew, P.D.; Kapatkin, A.S.; McKelvie, P.J.; Shofer, F.S.; Gregor, T.P. (2001) Evaluation of risk factors for degenerative joint disease associate with hip dysplasia en German Shepherd dogs, Golden Retrievers, Labrador Retrievers, and Rottweilers. *Journal of the American Veterinary Medical Association*. Vol. 219 N° 12 pp 1719-1724.
64. Smith, H.A.; Jones, T.C.; Hunt D.R. (1972):- Veterinary Patology, Edit. Lea and Febiger Philadelphia. Pp 1078 - 1079
65. Soto, I.; Zavala, P.; Cano, H.; López, J. (2002) Análisis de dos poblaciones de gallinas criollas (Gallus domesticus) utilizando RAPDs como marcadores moleculares. *Téc Peru Méx. Centro multidisciplinario de estudios en biotecnología* 40(3): 275-283

66. Suárez, T.M.A.; Carmona, P.T.; González, A. M.T. (2001) Fundamentos de la mejora animal, Edit. "Felix Verela", La Habana.
67. Tarrago, A. (2015) Diagnóstico y Tratamiento de la Displasia de Cadera y Lesiones de Cadera en General. Instituto Veterinario de Ortopedia y Traumatología.
68. http://www.traumatologiaveterinaria.com/index.php?web=displasia_cad/displasia.php Consultado en 7 febrero de 2015.
69. Thibaut, J.; Gotschlich, E.; Mansilla, M.; Campillo, C.; Vargas, L. (2005) Diagnóstico Clínico-radiográfico de displasia de cadera en perros Ovejero Alemán de la ciudad de Valdivia Chile. *Revista científica, Instituto de Ciencias Clínicas Veterinarias, Universidad Austral de Chile.*
70. Todhunter, R.J.; Blis S.P.; Casella, G.; Wu, R.; Lust, G.; Burton-Wurster, N.I.; Williams, A.J.; Gilbert, R.O. (2003) Genetic Structure of Susceptibility Traits for Hip Dysplasia and Microsatellite Informativeness of an Outcrossed Canine Pedigree. *Journal of Heredity*. The American Genetic Association 94: 329-48
71. Todhunter, R.J.; Mateescu, R.G.; Zhag, Z.; Dykes, N.L.; Burton-Wurster, N.I.; Lust, G. (2001) Diagnosis and Genetic Locus Mapping For Canine Hip Dysplasia. Cornell University, Ithaca N.Y.
72. Tsai, K.L.; Murphy, K.E. (2006) Clinical and genetic assessments of hip joint laxity in the Boykin spaniel. *The Canadian Journal of Veterinary Research*. 70:148-150
73. Verhoeven, G.; Fortrie, R.; Van Rissen, B.; Coopman, F. (2012). Worldwide screening for canine hip dysplasia: where are you now?. *Vet. Sug.* 41 (1) 10-9
74. Wang, X.; Millar, B.; Lepine, A.J.; Scout, J.D.; and Murphy, K.E. (1999) Análisis of Randomly Amplified Polimorphic DNA (RAPD) for identifying Genetics Markers Associated with Canine Dysplasia. *The American Genetics Association* 90: 90-103.
75. Wilson, B.; Nicholas, F.; James, J.; Wade, C.; Tammen, I.; Foadsma, H.; Castle, K.; Thompson, P. (2011). Symmetry of Hip Dysplasia Traits in the German Shepherd Dog in Australia. *Journal Animals Breed Genetics*. 128 (3) 230-40.
76. Wilson, B.; Nicholas, F.; Thompson, P. (2011) Selection Against Canine Hip Dysplasia: Success Failure. *Veterinary Journal* 189 (2) 160-8.
77. Woolliams, J.; Lewis, T.; Blotts, S. (2011) Canine Hip and Elbow Dysplasia in UK Labrador Retriever. *Vet. J.* 189 (2): 169-76.
78. Young, A.E.; Bannasch, D.L. (2008) SNPs in the promoter regions of the canine RMRP and SHOX genes are not associated with canine chondrodysplasia. *Animal Biotechnology*, Vol. 19 pp 1-5
79. Zhou, Z., Sheng, X., Zhang, Z., Zhao, K. (2010) Differential Genetic Regulation of Canine Hip Dysplasia and Osteoarthritis. *Plos ONE* 5 (10)

11. -ANEXOS

- 1.-Ejemplo de "Historia Clínica" Positivo a Displasia Coxo-femoral (DCF).
- 2.- Ejemplo de "Historia Clínica" Negativa a Displasia Coxo-femoral (DCF).

UNIVERSIDAD VERACRUZANA

INSTITUTO DE NEUROETOLOGÍA

DOCTORADO EN NEUROETOLOGÍA

PROYECTO DISPLASIA COXO – FEMORAL EN EL PERRO

HISTORIA CLÍNICA

Nº DEL CASO: 1

RESEÑA:

Nombre del propietario: Sr. Fair Rodríguez
 Dirección: Iguanas N° 460 Geo. Los Pinos
 Teléfono: 151-45-14

NOMBRE	RAZA	SEXO	EDAD	PESO	COLOR
Jack	Rottweiler	Macho	13 meses	40 Kg.	Golondrino

EXAMEN FÍSICO:

EXAMEN FÍSICO ESTÁTICA	EXAMEN FÍSICO DINÁMICA	PRUEBA DE ORTOLANI
Dolor en la articulación	Claudicación	Positivo

ESTUDIO RADIOLÓGICO:

RADIOGRAFÍA VENTRODORSAL SIMPLE		ÁNGULO DE NORBERG	
			
Resultado Subluxación craneal derecha	+	Resultado	+

OBSERVACIONES:	DIAGNÓSTICO DEFINITIVO A DISPLASIA COXOFEMORAL:
REACCIÓN PERIÓSTICA ENF. ART. DEGENERATIVA. +	POSITIVO

UNIVERSIDAD VERACRUZANA

INSTITUTO DE NEUROETOLOGÍA

DOCTORADO EN NEUROETOLOGÍA

PROYECTO DISPLASIA COXO – FEMORAL EN EL PERRO

HISTORIA CLÍNICA

N° DEL CASO: 6

RESEÑA:


Nombre del propietario: Ing. Rubén García
 Dirección: Tuero Molina N° 437
 Teléfono: 937-20-81

NOMBRE	RAZA	SEXO	EDAD	PESO	COLOR
AINZA	DOBERMAN	HEMBRA	1 AÑO 2 MES	30 KG.	GOLONDRINO

EXAMEN FÍSICO:

EXAMEN FÍSICO ESTÁTICA	EXAMEN FÍSICO DINÁMICA	PRUEBA DE ORTOLANI
SCPA	SCPA	NEGATIVO

ESTUDIO RADIOLÓGICO:

RADIOGRAFÍA VENTRODORSAL SIMPLE		ÁNGULO DE NORBERG	
			
Resultado	-	Resultado	-

OBSERVACIONES:	DIAGNÓSTICO DEFINITIVO A DISPLASIA COXOFEMORAL:
NINGUNA	NEGATIVO

