

DETERMINACIÓN EN CHILE DE ENFERMEDAD RENAL POLIQUÍSTICA MEDIANTE EXAMEN DE ADN EN GATOS DE RAZA PERSA Y EXÓTICO

DETERMINATION OF POLYCYSTIC KIDNEY DISEASE IN CHILE IN PERSA AND EXOTIC SHORT HAIR BREEDS BY TEST PCR

Casanueva, Rodrigo¹ MV .

Resumen

Objetivos: Identificar ejemplares positivos para la enfermedad renal poliquística mediante examen de ADN en gatos de raza Persa y Exótico, observar la prevalencia de PKD en gatos de raza Persa y Exótico en Chile y evaluar la continuidad de un reproductor positivo en un plan de cría, disminuyendo así la prevalencia de la enfermedad.

Materiales y Método: Se utilizó un total de 35 gatos de las razas persa y exótico, con edades entre las 8 semanas y los 8 años, todos ellos forman o formarían parte de un plan de cría. Para realizar la identificación de la mutación se tomaron muestras simples de ADN, extraídas de la mucosa oral.

Resultados: Los resultados de este estudio indican que mediante este método se identificó la mutación que define a esta patología en el 28,5% de los gatos testeados.

Palabras claves: PKD, enfermedad poliquística renal, persa.

INTRODUCCIÓN

LA ENFERMEDAD DEL RIÑÓN POLIQUÍSTICO (PKD) afecta principalmente a la raza persa y sus cruza. La enfermedad genera, en todos los casos, quistes renales que - por compresión - desencadenan una falla renal crónica, que llevará a la muerte de los gatos afectados.

Aproximadamente 16 diferentes genes dan cuenta de 22 mutaciones causantes de enfermedad en gatos y, ocho de estas, son mutaciones en gatos de raza ¹.

Si se considera que las raza puras representan el 20% de la población total de gatos

y que de ellos el 80% son Persas, esto hace que la enfermedad del riñón poliquístico también conocida como PKD (sigla proveniente del inglés, Polycystic Kidney Disease) sea la enfermedad heredable más común en gatos^{2,3}.

La estadística indica que el 38% de los gatos Persas en Estados Unidos son positivos a PKD2. Esta frecuencia coincide con la prevalencia de países como Suecia y Noruega³.

ANTECEDENTES

El PKD, enfermedad hereditaria de

¹Médico Veterinario, Universidad de las Américas. Diplomado en Medicina Felina, Universidad Mayor. Clínica Veterinaria Topcat. Alférez Real 1069, Providencia, Santiago (www.topcat.cl)

carácter progresivo e irreversible³, es reconocida mundialmente como una enfermedad significativa, que afecta principalmente a la raza Persa⁴ y a las razas directas a partir de ella como el Exótico e Himalaya¹.

El uso de los persas en el desarrollo de otras razas, tales como el Birmano, Burmilla⁴, Selkirk Rex, Scottish Fold, Ragdoll y American Shorthairs^{1,2} puede introducir el gen mutado; esta herencia es independiente respecto al gen responsable del pelo largo o el rasgo facial de braquicefálico del persa⁴.

El PKD fue descrito clínicamente por primera vez como una enfermedad heredable de forma autosomal dominante (ADPKD) en 1990, por Biller y colaboradores¹; estos estudios demostraron la forma de herencia donde machos y hembras eran afectados indistintamente y, dependiendo del estado de los progenitores, los porcentajes de gatos afectados varían. La cruce entre positivos y negativos generó un 58% de positivos mientras que la cruce de positivos con positivos genera un 73% de la progenie afectada. Estos resultados son compatibles con el tipo de herencia dominante de un gen autosomal⁵.

Esta enfermedad se caracteriza por el desarrollo de quistes que varían en tamaño y número, los cuales se pueden encontrar tanto en la corteza como en la medula renal y, ocasionalmente, en hígado, útero y/o páncreas^{4,7}.

La causa exacta del PKD actualmente se encuentra bien identificada y consiste en una mutación del gen PKD1 en el cromosoma felino E3², específicamente en exon 29². Es aquí, en la posición identificada como c10063a¹, donde se produce un cambio de un aminoácido, generando un codón de parada OPA lo que interrumpe aproximadamente el 25% del C-terminal en la formación de la proteína normal, generando de esta manera una proteína mutada llamada polycystin. Los gatos con esta falla son fuertes candidatos para expresar el fenotipo de PKD^{1,2}. Esta mutación es identificada solo en gatos heterocigotos y ninguno presenta dos copias de este gen, ya que la mutación es letal para el embrión por lo cual los gatos afectados de forma homocigota mueren dentro del útero^{2,7}.

Es la proteína polycystin mutada la causante de la formación de los quistes. En humanos está demostrado que los quistes pueden originarse en cualquier segmento del nefrón; hasta la fecha se sugiere que esto es igual en los felinos afectados con ADPKD⁶.

Los quistes pueden estar vacíos o contener fluido, que por lo general es transparente, pudiendo

tener un aspecto amarillento, con fibrina, contener flóculos o incluso sangre⁶.

Histológicamente, la mayoría de los quistes están limitados por una monocapa de células bajas cuboidales o un epitelio escamoso⁶.

Inicialmente, los quistes son muy pequeños y tienden a incrementar su tamaño con la edad^{4,6}; no así el número, el cual tiene marcadas diferencias entre individuos, pero no se modifica esta cantidad de quistes con el aumento de la edad⁶.

El tamaño no necesariamente está asociado a la cantidad de fibrosis y compresión que los quistes generan; algunos quistes pequeños presentan grandes áreas de fibrosis con marcada compresión del tejido adyacente, lo cual generará el daño renal funcional posterior⁶.

En un estudio histopatológico se observó que los gatos afectados presentaban comúnmente nefritis túbulointersticial dispuesta en múltiples focos, hasta una extensa infiltración de linfocitos en conjunto a células plasmáticas y neutrófilos anormales. Estas lesiones se acompañan por fibrosis intersticial y atrofia del epitelio tubular; esto terminará, en un tiempo no determinado, en falla renal⁶.

Al igual que en humanos, los gatos tienen amplios rangos de severidad para la enfermedad, existiendo un potencial genético, influencia del medio ambiente y otros factores, los que modifican la rapidez de progresión^{2,4}. Entonces, la velocidad con que la enfermedad progresa a la falla renal es altamente variable e impredecible⁴. En grandes colonias de gatos afectados, el promedio de edad para la presentación de fallo renal azotémico es de 7 años, con un rango entre los 3 años y los 10 años⁴.

Los signos clínicos esperados de falla renal crónica incluyen anorexia, letargia y deshidratación, sumado a la confirmación bioquímica en los estadios II a IV de IRIS de la presencia de azotemia (aumento de nitrógeno ureico sanguíneo y creatinina), hiperfosfatemia, acidosis metabólica y pérdida de la capacidad de concentración de la orina^{6,8}.

Se detectó en una evaluación inicial de pacientes felinos con PKD que el 20% de los gatos que ya cursaban con insuficiencia renal crónica eran hipertensos. Aunque la hipertensión no es una complicación exclusiva del PKD, puede contribuir con una rápida declinación de la función renal⁸.

Aunque el fallo renal crónico es de carácter progresivo en felinos, culminando con la muerte, la progresión de la enfermedad en la especie ha

demostrado que no necesariamente presenta un patrón lineal; algunos gatos afectados manifiestan elevaciones abruptas de concentración sérica de creatinina lo cual genera crisis y fallas inesperadas para los propietarios ⁸.

El manejo y medidas terapéuticas tempranas del fallo renal crónico, como son las modificaciones dietéticas, la restricción de proteínas en estadios avanzados y la restricción de fósforo son la base para el manejo del PKD y han demostrado grandes beneficios si se realizan de forma anticipada ⁸.

Se hace importante entonces la identificación temprana de los gatos afectados para hacer un manejo oportuno de la enfermedad y, especialmente, evitar la herencia del PKD. La identificación temprana de los afectados puede efectuarse mediante ultrasonografía, pero esta técnica presenta dificultad en identificar pequeños quistes; por otro lado, los quistes medulares pueden ser más difíciles de identificar de forma certera, especialmente si son pequeños ⁴.

La ultrasonografía tiene una sensibilidad de 91% para el diagnóstico en gatos de más de 36 semanas de edad, pero solo un 75% en gatos menores de 16 semanas de edad ⁴.

El examen para PKD por ADN, a diferencia de la ultrasonografía, puede ser realizado a temprana edad, con una pequeña cantidad de muestra colectada y prácticamente con un 100% de exactitud ⁷.

El método consiste en la aislación del ADN desde células colectadas por una técnica estándar de cloroformo-fenol; luego, el ADN obtenido es amplificado por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para encontrar el gen PKD. Este es amplificado independientemente para lograr observar la mutación ².

Una vez identificados los gatos positivos, se sugiere que la eliminación de los programas de cría sea lenta y cuidadosa; de esta forma se asegura la mantención de los buenos genes. La esterilización de la masa total de gatos positivos no es recomendada ⁷.

Teniendo en cuenta tres factores, la herencia, prevalencia en la población y las consecuencias en la salud a mediano y largo plazo, es que se trabaja en la erradicación de esta patología a nivel mundial; esto se logra mediante un estricto control de los animales que se van a utilizar en reproducción, identificando tempranamente a los gatos positivos ³.

MATERIALES Y MÉTODO

La muestra comprendió un total de 35

gatos de raza Persa y Exótico, los que se dividen en 33 persas y dos exóticos. La edad varió entre las ocho semanas y los ocho años, con un promedio de un año ocho meses y una moda de dos años. De la muestra, 21 ejemplares correspondieron a hembras y 14 a machos.

La población estuvo conformada por 21 gatos nacidos en Chile y 14 gatos que fueron importados y testeados en Chile; ninguno de ellos presentaba antecedentes de la enfermedad en las líneas de sangre ni presentaba signos de enfermedad aparente al examen clínico.

Parte de los gatos evaluados ya estaban en reproducción y serían sometidos a evaluación zootécnica posterior según los resultados obtenidos. Otros eran gatos que formarían parte de un plan de cría solo en caso de tener un resultado favorable.

Es importante considerar que, pese a que se menciona en la literatura al Himalaya como una raza distinta al persa, para este estudio no se hace diferencia entre las razas Persa e Himalaya ya que actualmente se consideran como una sola raza y el estándar es el mismo para ambos tipos, considerándose al Himalaya una variedad en el color del persa (Himalaya o persa colour point); este mismo criterio se considera en la raza Exótico donde uno de los gatos testeados es un Exótico color punto o punteado (colour point), este, al igual que en el caso del Himalaya, se considera una variedad de color de la raza y no una raza distinta.

Las muestras fueron derivadas al laboratorio de genética de la Universidad de Davis, división veterinaria, a cargo del Dr. Lyons Dent, el cual especifica el protocolo de colecta y envío ⁹:

Protocolo de colecta:

* Se recomienda el examen principalmente a gatos de raza Persa, Himalaya y Exótico así como a las cruces con cualquiera de estas razas. Su uso queda abierto para aquellas razas que son potencialmente afectadas, así como para cualquier gato del cual se sospeche de la enfermedad.

* La edad mínima recomendada es entre las 8 y 10 semanas y no está contraindicado el examen para hembras gestantes.

* La muestra se colecta con un cepillo de citología o con tómulas de algodón; el laboratorio indica distintas marcas comerciales de cotoncitos. Para este estudio se realizaron algunas muestras con cepillo de citología y otras con tómulas o cotoncitos comunes.

* Se introduce el dispositivo de muestreo dentro de la boca, entre la mejilla y la encía; una vez

que se asegura el correcto contacto de las mucosas con el dispositivo, se rota a la vez que se cepilla por unos 10 segundos. Este procedimiento se debe hacer de forma suave sin lastimar la mucosa. Se deben tomar dos muestras, una por cada mejilla.

* En caso de usar cotoncitos o tómulas se toman cuatro muestras totales, dos por cada mejilla (Ver figura 1).

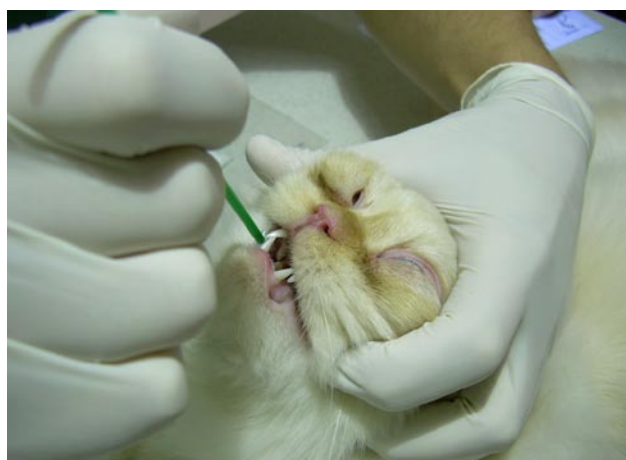


Figura 1: Colecta de células con un Brush de citología para examen PKD por ADN.

* Deben utilizarse guantes durante el procedimiento, así se evita contaminar la muestra en caso de tocar el extremo del dispositivo de muestreo, lo que podría interferir con el correcto análisis.

* La muestra ya colectada se agita o se deja al aire sin soplar por 30 segundos, asegurando el correcto secado. La humedad que pueda quedar en la muestra sumado al cierre del empaque favorece el crecimiento bacteriano destruyéndola. Debido a la posibilidad de humedad en la muestra se indica que el cierre del empaque no sea hermético.

* La muestra se adjunta a la solicitud (formulario) y se almacena en un lugar a temperatura ambiente.

* La muestra tiene que ser acompañada con la mayor cantidad de antecedentes del paciente, como nombre, edad, sexo, color, número de inscripción de pedigree, federación a la cual pertenece, nombre del criadero, nombre del propietario y antecedentes de PKD de los padres.

Contraindicaciones para la toma de muestra.

* No tomar muestra a gatos que hayan sido alimentados recientemente.

* No muestrear gatitos en período de lactancia, ya que la presencia de células maternas

en la cavidad oral puede derivar en un incorrecto testeo.

* La edad mínima de testeo es 8 semanas.

Código de resultados.

Los resultados emitidos por el laboratorio de genética de la Universidad de Davis son en base a la forma genotípica de denominar la enfermedad, la cual es representada por la letra mayúscula "P", mientras que un gato carente de la enfermedad se identifica con la letra mayúscula "N". Es así que un gato heterocigoto positivo para la enfermedad es "NP" y un gato negativo "NN" (Ver Figuras 2 y 3).

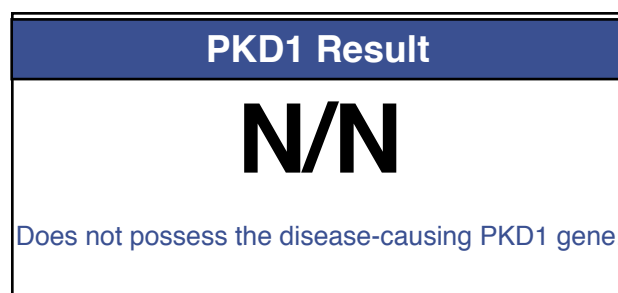


Figura 2: Identificación de un gato negativo para PKD.

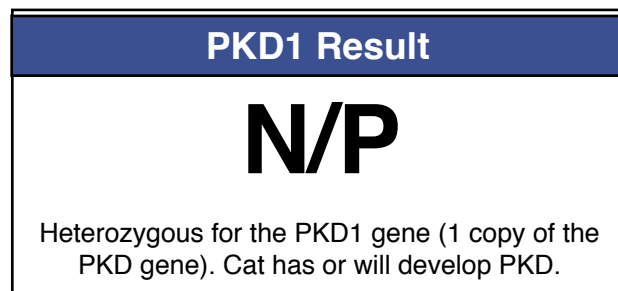


Figura 3: Identificación de un gato positivo heterocigoto para PKD.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

De los 35 gatos que fueron testeados mediante muestras de ADN, se encontró la mutación en diez de ellos, los cuales representan el 12,8% de la población total. Este resultado se acerca a estudios realizados en múltiples países donde la prevalencia para PKD es siempre sobre el 30%³. Por esto, de la población muestreada podemos concluir que el 71.5% es negativa para la enfermedad ya que no se encontró la mutación.

Los diez gatos positivos para la enfermedad son todos representantes de la raza Persa. Este resultado no es inesperado si bien pudiese ser distinto si se evalúa a un mayor número de ejemplares de la raza Exótico.

De los 21 gatos nacidos en Chile, ocho resultaron ser positivos, equivalente al 38,09% de los felinos chilenos. De los 14 gatos importados, dos resultaron positivos para la presencia de la mutación, lo cual equivale al 14,28% de la población de importados. Esto nos confirma claramente que el PKD es una enfermedad de prevalencia mundial.

La muestra se conformó por 21 hembras, de las cuales siete resultaron positivas a PKD, equivalentes al 33.3% de las hembras. De los 14 machos evaluados, tres resultaron positivos para la mutación, equivalente al 21,4% del total de machos. Estos resultados indican que, al igual que los estudios realizados por Biller y colaboradores³, tanto machos como hembras son afectados y que la herencia se basa en genes autosomales y no sexuales⁵.

Todos los resultados enviados por el laboratorio de genética de la Universidad de Davis correspondieron a heterocigotos, esto quiere decir que solo presentaron la mutación en uno de los cromosomas. Esto coincide con lo descrito en la literatura ya que la patología en la práctica se identifica solo en gatos heterocigotos y ninguno presenta dos copias de este gen, dado que la mutación es letal para el embrión^{2,7}.

De los 35 gatos ingresados al estudio, seis corresponden a la progenie de cruza de padres que también fueron parte del estudio. De estos seis gatos, cuatro correspondieron a hijos positivos desde el cruzamiento entre un reproductor positivo y uno negativo, mientras que de los dos negativos uno era resultado de una cruce de ambos padres positivos para la mutación. De esta observación podemos destacar que la presencia de la mutación en ambos padres, coincidiendo con lo observado por Biller y colaboradores³, deja alrededor de un 25% de probabilidad de tener una descendencia negativa para la enfermedad, cumpliendo la herencia de un gen autosomal dominante.

Todos los gatos positivos para la enfermedad fueron evaluados según características zootécnicas, estándar de la raza y habilidades de reproductor, entre otros aspectos, para decidir la continuidad en el criadero. Solo uno de los diez gatos positivos sigue participando de un plan de cría a la espera de un descendiente negativo.

Los gatos negativos recibieron la certificación oficial de validez internacional emitida por el laboratorio mediante un certificado de análisis de ADN (Ver Figura 4).

DNA ANALYSIS CERTIFICATE

MEDITERRANEO DON CHE OF TOPCAT

Breed: Persian
Sex: Male
Color: White B.E.
DOB: 09/19/2008
Reg: 19092008007
Microchip:

Case: CAT27771
Report Date: January 7, 2010
Report ID: 6309-7294-9861-2006

PKD1 Result

N/N

Does not possess the disease-causing PKD1 gene.

Identity Panel

S	L	P	S	H	N
F	C	F	F	F	C
A	A	A	A	A	A
9	2	9	9	4	6
7	0	9	9	9	8
5	0	9	9	9	8
T	L	P	V	L	N

Veterinary Genetics Laboratory
One Shields Avenue, Davis, CA 95616
530-752-2211
www.vgl.ucdavis.edu

RODRIGO CASANUEVA
LYNCH NORTE 219 CASA - O
LA REINA, SANTIAGO
CHILE. 7850000

Figura 4: Certificado de análisis emitido por el laboratorio de genética de la Universidad de Davis de un gato negativo para PKD

CONCLUSIONES

El test de ADN para PKD1 ofrece una rápida, accesible, temprana y, especialmente, confiable forma de detectar los gatos positivos para una mutación presente en nuestro país, que se detectó en el 28,5% de los gatos que participaron en este estudio, siendo la raza persa la única afectada.

Mediante este simple examen se logró detectar, con una pequeña muestra de células orales, a gatos positivos de tan solo ocho semanas de vida, evitándose de esta manera la herencia de la enfermedad antes que estos ejemplares llegaran a madurez sexual y que ingresaran a un plan de cría, puesto que fueron esterilizados luego de recepcionados sus certificados de PKD. Los gatos que ya se encontraban en reproducción también fueron esterilizados, evitándose en el mejor de los casos que transmitan la mutación al 50% de la descendencia.

La calidad del resultado que ofrece el test de ADN para PKD permite, de forma temprana, no solo evitar la reproducción de los afectados sino que abre un abanico de posibilidades del manejo de estos gatos instaurando terapias y monitoreo de la función renal antes de que los gatos presenten algún signo de la enfermedad, ayudando a aumentar la sobrevida de los gatos afectados.

Referencias bibliográficas

1. Lyons L. Unraveling the Genetic Mysteries of the Cat: New Discoveries in Feline-Inherited Diseases and Traits En: Gustafson J, Taylor J, Stacey G. Genomics of Disease 24th Volume. Springer. USA, 2008: 41-55.
2. Lyons L. ; Biller D. ; Erdman C et al. Feline Polycystic kidney Disease Mutation Identified in PKD 1. J Am Soc. Nephrol 15: 2548, 2004.
3. Millán L.; Iglesias I.; Rodríguez J.; Gonzalo J. Importancia de la Enfermedad Renal Poliquística en el Gato Persa. Disponible en <http://aamefe.org/pkd.htm> (consultado febrero 18, 2010).
4. Cannon M.; Mackay A.; Barr F.; Rudolf H.; Bradley K.; Gruffydd-Jones T. Prevalence of Polycystic Kidney Disease in Persian Cats in the United Kingdom. Veterinary Record 149, 409-411.2001.
5. Biller D.; DiBartola S.; Eaton K.; Pflueger S.; Wellman S.; Radin J. Inheritance of Polycystic Kidney Disease in Persian Cats. Disponible en <http://www.felinepkd.com/>

[engohio.html](#) (consultado febrero 13, 2010).

6. Eaton K.; Biller D.; DiBartola S et al. Autosomal Dominant Polycystic kidney Disease in Persian-cross Cats. Vet Pathol 34:117 126, 1997.
7. Lyons L. Polycystic Kidney Disease (PKD) Feline PKD DNA Test. Disponible en <http://www.vetmed.ucdavis.edu/PHR/LyonsDen/PKDDNAtest.htm> (consultado febrero 24, 2010).
8. Ross J.; Polzin D.; Osborne C. Progresión Clínica de la Falla Renal Crónica Temprana y Sugerencias Para el Manejo En: August J. Medicina Interna Felina, volumen 5, Intermédica, Argentina 2008.
9. Lyons L. DNA Sampling and Shipping Protocols. Disponible en <http://www.vetmed.ucdavis.edu/PHR/LyonsDen/Protocolsframe.html> (consultado febrero 19, 2010).