

I. Clasificación temática : Dermatología

II. Título: **Susceptibilidad genética a la Demodicosis Juvenil Generalizada Canina**

It Verónica, Díaz Silvina, Castellano MC, Manzuc P, Golijow CD, Giovambattista Guillermo

It Verónica Becaria Doctoral CONICET, Ayudante Diplomado Cátedra Genética y Biometría Facultad Ciencias veterinarias UNLP.

Díaz Silvina, Investigador Asistente del CONICET, Jefe de Trabajos prácticos Cátedra genética Microbiana, carrera bacteriología Facultad Ciencias Veterinarias UNLP

Castellano MC, Profesor Adjunto Cátedra Clínica pequeños Animales Facultad Ciencias Veterinarias UNLP

Mansuc P, Docente Hospital Escuela - FCV - UNLP. Profesional Independiente.

Golijow, Profesor Adjunto Cátedra Genética y Biometría Facultad Ciencias veterinarias UNLP.

Giovambattista, Investigador Adjunto CONICET, Profesor Adjunto Cátedra Genética y Biometría Facultad Ciencias veterinarias UNLP.

Susceptibilidad genética a la Demodicosis Juvenil Generalizada Canina

Abstract:

Demodectic mange is caused by a microscopic mite called *Demodex canis*. All dogs raised normally by their mothers possess this mite as mites are transferred from mother to pup via cuddling during the first few days of life. For some reason, conditions change in certain dogs to allow demodex mites to "gain the upper hand;" the mites proliferate and can cause serious skin disease. Affected animals might have a T cells inherited disorder, that won't let them recognize the antigen. The canine major Histocompatibility complex (MHC), called Dog Leukocyte Antigen (DLA), has been extensively studied. Histocompatibility typing to determine which alleles of polymorphic genes are present is important for studying associations between DLA and infectious diseases. The aim of this study was to determine polymorphism of the DLA-DRB1 and some genetic markers, to start an association study to demodectic mange in Boxer, Argentinian mastiff and Shar pei dogs. The first results have shown genetic variability within and between breeds, which could be due to different response of individuals to parasite infection. Further analysis will help to establish association between the markers and the disease in order to select individuals that are more susceptible to the infection.

Key words: DLA- demodectic mange- dog- genetic

Resumen:

La demodicosis canina es una enfermedad parasitaria de la piel producida por la presencia de un número superior al normal del ácaro *Demodex canis*. La transmisión del ácaro se produce por contacto directo a partir de la madre, durante los 2 o 3 primeros días de vida. En algunos individuos se verifica una proliferación excesiva del parásito, que produce la destrucción del folículo piloso y el desarrollo de la enfermedad. La hipótesis propuesta para explicar este fenómeno sostiene que los animales afectados presentan un defecto hereditario específico de los linfocitos T que imposibilita el reconocimiento del antígeno, permitiendo así el aumento de la población parasitaria. El Complejo Principal de Histocompatibilidad (MHC) canino, denominado *Dog Leukocyte Antigen System* (DLA), contiene genes que codifican las moléculas que participan en la presentación de antígenos propios y extraños al sistema inmune. Estudios previos han puesto de manifiesto la asociación entre los genes del MHC con la susceptibilidad/resistencia a enfermedades infecciosas en diversas especies de animales domésticos. El objetivo del presente trabajo consiste en realizar un estudio detallado del polimorfismo del gen DLA-DRB1 y marcadores ligados al DLA como estrategia inicial, que permitirá determinar la susceptibilidad a demodicosis juvenil generalizada en las razas Shar pei, Dogo Argentino y Boxer. Los resultados preliminares han demostrado la presencia de

variabilidad genética dentro y entre las razas estudiadas, la que podría estar asociada con las diferencias en las respuestas individuales ante el parásito. La identificación de los genes más importantes de susceptibilidad/resistencia permitirá un mejor entendimiento de la patogénesis de la enfermedad y facilitará el desarrollo de estrategias terapéuticas tempranas o programas de selección para disminuir la incidencia de la misma en las poblaciones.

Palabras claves: DLA- demodeccia -perro- genetica

Introducción

La demodicosis canina es una enfermedad parasitaria de la piel producida por la presencia de un número superior al normal del ácaro *Demodex canis* (1). Básicamente, se reconocen dos formas clínicas de demodicosis: localizada y generalizada (figura 1 y 2). La primera se caracteriza por la presencia de escasas áreas alopécicas y eritematosas, suele remitir en forma espontánea y no reconoce una predisposición hereditaria. Contrariamente, la forma generalizada constituye una de las enfermedades cutáneas más graves del perro y se manifiesta con lesiones extensas y foliculitis severa, siendo la sexta enfermedad cutánea más frecuente en caninos y la principal dermatopatía en animales jóvenes (2). Cuando se presenta en animales adultos, suele obedecer a procesos primarios adquiridos que alteran la respuesta inmune o bien a tratamientos inmunosupresores. No obstante, la mayor prevalencia se observa en perros de 3 a 18 meses de edad, denominándose en esos casos “juvenil”. La transmisión de *D. canis* se produce por contacto directo a partir de la madre, durante los 2 o 3 primeros días de vida. El ácaro es un habitante normal de la piel del perro, aunque su población es muy reducida en el animal sano. Este se encuentra en el folículo piloso y, ocasionalmente, en las glándulas sebáceas y sudoríparas apócrinas adyacentes. Diversos estudios sugirieron que la demodicosis juvenil generalizada tendría un modo de herencia autosómica recesiva (3). Sin embargo, en algunos individuos se verifica una proliferación excesiva del parásito que lleva a la destrucción del folículo piloso y al desarrollo de la enfermedad. La enfermedad se diagnostica mediante raspado cutáneo profundo y observación del acaro al microscopio óptico (figura 3).

La hipótesis propuesta para explicar este fenómeno sostiene que los animales afectados presentan un defecto hereditario específico de los linfocitos T que imposibilita el reconocimiento del antígeno, permitiendo así el aumento de la población parasitaria. No obstante, existe la posibilidad de que dicho defecto resida en la alteración de la capacidad de los macrófagos como células presentadoras de antígenos (4), ya que éstos median las respuestas inmunes (via MHC-II) para presentar antígenos a los linfocitos T reactivos (5, 6).

Estudio de Marcadores Genéticos en Enfermedades

El desarrollo de una prueba de ADN para una enfermedad genética siempre es complejo, pero el proceso se simplifica cuando la enfermedad tiene la misma causa genética en más de una especie y el gen ha sido clonado. Los genetistas generalmente pueden identificar un número de genes causantes potenciales (referidos como **genes candidatos**) Por ejemplo: un gran número de genes posee mutaciones que producen cataratas en humanos y ratón, cada uno de estos genes es candidato para producir cataratas en perro. Un gen candidato puede producir cataratas en una raza o varias, pero no en todas, en cuyo caso los genes restantes deben ser evaluados (7).

El primer paso para evaluar si un gen es el causante de una enfermedad es establecer la variación genética en una región del ADN cercana al gen candidato. Estas regiones genéticamente variables del ADN son los **microsatélites**, secuencias no codificantes, repetidas 20 o más veces. Los microsatélites son útiles porque muestran el grado de variación genética de una población. Estos son **marcadores moleculares**, que se seleccionan cerca del gen candidato, y que proveen la variación genética necesaria para determinar si este es heredado con la enfermedad, o si el gen candidato es el que produce la enfermedad. También los microsatélites se utilizan para estudiar el genoma. En el presente estudio se seleccionaron por su función en la respuesta inmune como genes candidatos a los loci del Complejo Principal de Histocompatibilidad Canino.

Complejo Principal de Histocompatibilidad

El Complejo Principal de Histocompatibilidad (MHC) en perros, denominado *Dog Leukocyte Antigen System* (DLA), contiene genes de clase I, II y III, aunque el número preciso y sus posiciones relativas permanece desconocida (figura 4) (8 -11). Las moléculas de clase II son glicoproteínas de membrana constituidas por una cadena α y una β , codificadas por genes independientes. Cada una de dichas cadenas está formada por dos dominios extracelulares, uno transmembrana y uno intracelular (figura 5). El primer dominio de las cadenas α y β (codificado por el exón 2) forman el sitio de reconocimiento del antígeno (ARS). Es por esta razón, que las variaciones en la secuencia del segundo exón de los genes DR y DQ determinan la especificidad entre la molécula de clase II y el péptido antigénico.

Los estudios de la región DLA-clase II, utilizando la técnica de RFLP (*Restriction fragment length polymorphism*), indicaron la presencia de al menos 4 genes DLA de clase II de tipo α y 7 genes de tipo β (12 – 14). A diferencia de lo observado en los humanos y en otros mamíferos, todos los linfocitos del perro expresan los genes DLA de clase II en la superficie celular. Muchos de los genes DLA-D son altamente polimórficos. Hasta el presente, se reportaron 52 secuencias alélicas DLA-DRB1, 16 DLA-DQA1 y 41 DLA-DQB1 (15 - 20).

Las moléculas del MHC son responsables de la presentación al sistema inmune de los antígenos propios y extraños, así como de determinar el nivel de respuesta generada. Además, los genes del MHC han sido asociados con susceptibilidad/resistencia a otras enfermedades como la dermatofitosis bovina, leucosis bovina y ovina, y la enfermedad de Adisson en caninos. Es por esta razón que los estudios detallados del polimorfismo de los genes del DLA pueden ser altamente informativos para determinar la especificidad de la respuesta inmune, la susceptibilidad/resistencia a enfermedades como la demodicosis juvenil generalizada y desordenes autoinmunes (21 – 24).

Materiales y métodos

Toma de Muestras: Se muestrearon un total de 177 animales procedentes de la Cátedra de Clínica de Pequeños Animales de la Facultad de Ciencias Veterinarias (UNLP), de 5 criaderos y de 6 clínicas privadas de la provincia de Buenos Aires. Las muestras corresponden a los siguientes animales:

Razas	Número total	sanos	enfermos
Shar-pei	64	59	5
Dogo Argentino	15	10	5
Boxer	14	0	14
Viejo Pastor Ingles	2	0	2
Doberman	4	1	3
Otras razas	46	20	26
Mestizos	32	20	12
Total	177	110	67

Se diagnosticó demodicosis juvenil generalizada por raspados de piel donde se identificó la presencia del ácaro *D. canis*. Se registraron datos de la descripción clínica, sexo, edad, tipo de tratamiento, etc, y se muestrearon, cuando fue posible, los individuos emparentados.

Extracción de ADN: El ADN total se extrajo utilizando los siguientes métodos de acuerdo al tipo de muestra obtenida:

Tipo de muestra	Método de extracción
Sangre	DNA _{ZOL} (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA).
Tarjeta	ISOCODE (Schleider y Schuell, Dassel, Alemania)
Hisopado bucales	ISOCODE (Schleider y Schuell, Dassel, Alemania)
Pelo	Lisado con OHNa /temperatura y neutralización con HCl

De acuerdo con los resultados obtenidos, el método de extracción de sangre con DNA_{ZOL} fue el más eficiente por volumen y calidad de ADN obtenido. Esto último se evaluó utilizando geles de agarosa 1% 0,5X TBE teñidos con bromuro de etidio. Sin embargo, las otras metodologías brindan una alternativa rápida, poco invasiva, que pueden ser utilizadas para el diagnóstico de rutina.

Métodos de Tipificación. Se analizó una región del gen de Clase II *DLA-DRB1* y dos microsatélites ligados al *DLA*.

DLA-DRB1. Con el fin de caracterizar la variabilidad genética del gen *DLA-DRB1* se analizó el exón 2. La genotipificación del exón 2 del gen *DLA-DRB1* se realizó mediante la técnica de PCR, utilizando como primer 5' el cebador descrito por Wagner y col. (25; 5'-CCGTCCCCACAGCACATTC -3'), mientras que el primer reverso se rediseño a partir del consenso de las secuencias disponibles en la base de datos GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/>; 5'- TCGCCGCTGCACCGTGAAGCT-3'). El polimorfismo presente en el producto de amplificación se analizó mediante PCR-RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*). Para desarrollar el método de PCR-RFLP se analizaron los sitios de restricción presentes en las 54 secuencias del exón 2 previamente reportadas, utilizando el programa de computación Webcutter 2.0 (Max Heiman, Copyright 1997, Yale University in New Haven, CT, USA). Con la información obtenida se seleccionaron las tres enzimas de restricción (*HaeIII*, *RsaI* y *MspI*) que permitieron

diferenciar el mayor número de variantes alélicas posibles. Los patrones de restricción de los productos de amplificación se discriminaron mediante corridas electroforéticas en geles de acrilamida-bisacrilamida 10% (19:1) 1X TBE, teñidos con bromuro de etidio y visualizados con luz ultravioleta. Los alelos fueron definidos mediante la combinación de los patrones de restricción de las tres enzimas utilizadas.

Microsatélites. Con el fin de complementar la información obtenida del estudio de los genes DLA y para realizar la posterior asociación entre los marcadores genéticos y los individuos sanos y/o enfermos; se genotipificaron los microsatélites de clase I *FH2200*, y de clase II *FH2202*. Los STRs (*Short Tandem Repeats*) se amplificaron por PCR y se sometieron a electroforesis capilar y fluorescencia inducida por laser en un sistema de secuenciación automática de ADN (MegaBace 1000, General Electric) (figura 6).

Análisis Estadístico: Las frecuencias génicas y genotípicas para los loci analizados en cada una de las razas y en el número total de animales muestreados se estimaron por conteo directo. Los niveles de diversidad y de diferenciación génica entre los grupos se evaluó mediante los índices de heterocigosidad esperada (h_e), número de alelos detectados (n_a) y F_{ST} utilizando el programa de computación Arlequin (26).

Resultados

DLA-DRB1: el análisis teórico de los sitios de restricción de las 54 secuencias del exón 2 del *DLA-DRB1* con las enzimas *HaeIII*, *RsaI* y *MspI* evidenció: 1) nueve patrones para *HaeIII*; 2) diez para *RsaI* y 3) seis para *MspI*. Como consecuencia, se pudieron definir 33 alelos determinados por el método de PCR-RFLP. En las muestras analizadas, se detectaron 8 patrones para *HaeIII*, 6 para *RsaI* y 4 para *MspI*. Este método demostró pocos alelos dentro de cada raza y diferente combinación de alelos entre las distintas razas. Estos resultados concuerdan con lo reportado para otros marcadores genéticos. Además, cabe resaltar que los niveles de diferenciación genética estimada entre razas de perros domésticos contrasta marcadamente con lo observado en otras especies y es uno de los más altos reportado en poblaciones de animales domésticos (27 - 30).

Microsatélite. El microsatélite *FH2200* de clase I resultó monomórfico, mientras que el *FH2202* de clase II evidenció un alto nivel de polimorfismo ($n_{a\ total} = 13$), definiendo un valor de h_e de 0,78 a 1 según la raza. El número de alelos dentro de cada raza varió entre 8 y 13. En el primer caso, los resultados obtenidos se deberían a las condiciones experimentales,

dado el gran tamaño del microsatélite (400-500 pb), se hace necesario repetir los estudios modificando las condiciones de corrida. Por otra parte, el microsatélite *FH2202*, con un tamaño de entre 250 y 350 pb, resultó altamente informativo para caracterizar las poblaciones debido al elevado nivel de polimorfismo (31). Además, es interesante resaltar que la mayoría de las razas analizadas mostraron un exceso significativo de homocigotos ($F_{IS} > 0,153$) y que la mayor parte de la variabilidad total se debió a las variaciones dentro de cada raza más que a las variaciones entre las razas.

Discusión:

Como en la mayoría de las enfermedades infecciosas, solo una proporción de los individuos expuestos al patógeno se infectan y evidencian enfermedad clínica. Al menos en parte, esta variabilidad individual está determinada por efecto combinado de las proteínas del hospedador (codificadas por una serie de genes que controlan la cantidad y calidad de interacción parásito-hospedador) y la respuesta inmune del mismo. La identificación de los genes más importantes de susceptibilidad /resistencia permitirán un mejor entendimiento de la patogénesis de la enfermedad y facilitarán el desarrollo de estrategias terapéuticas o programas de selección para disminuir la incidencia de la misma en las poblaciones. La eliminación de los perros enfermos o "portadores" (padres y hermanos) de un programa de crianza reducirá significativamente la incidencia de la enfermedad en esa población canina. Con el seguimiento de este programa selectivo estricto, algunos criadores virtualmente han eliminado la enfermedad de sus líneas reproductivas (32).

La metodología utilizada demostró ser de gran utilidad para caracterizar la variabilidad genética en las poblaciones estudiadas. Una vez finalizada la tipificación de los grupos de animales sanos y enfermos se podrá relacionar la susceptibilidad o resistencia al desarrollo de la demodicosis juvenil generalizada con los diferentes genotipos. Esto permitirá detectar tempranamente los individuos susceptibles a esta enfermedad y de esta forma instaurar una terapia preventiva y eliminarlos del plan de cría.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Leydig 1859 *Demodex canis* Leydig, F. Über Haarsackmilben und Kratzmilben. Arch. Naturg. 25: 338-354..
2. Pérez Tort G, Sigal Escalada G. Demodicosis en caninos y felinos .Intermédica.2006

3. Muller, GH. 1990. Skin diseases of the Chinese Shar-Pei. *Vet Clin North Am/Small Anim Pract* **20** (6): 1655-1670.
4. Castellano, M.C.; Portiansky E.L. Participación del macrófago en la patogenia de la demodectosis canina. *Rev Med. Vet.* **69** **3**. 1988.
5. Hirsch, DC ; Baker, BB; Wiger, N; Yaskulski, SG; Osburn, BI: Suppression of *in vivo* lymphocyte transformation by serum from dogs with generalized demodicosis. *Am J Vet Res* **36**: 1591-5, 1975.
6. Scott DW ; Miller ; Griffin .*Dermatología en Pequeños Animales* , **6** :473-490. 1990.
7. Díaz S., Ripoli M.V., Peral-García P., Giovambattista G. 2005. Marcadores genéticos para resistencia y susceptibilidad a enfermedades infecciosas en animales domésticos. Los loci del Complejo Principal de Histocompatibilidad (MHC) como genes candidatos. *Analecta Veterinaria* **25** (1): 40-52.
8. Bull, R.W ; Vriesendorp, H.M ; Cech, R ; Grosse-Wilde, H ; Bijma, A.M ; Ladiges, W.L ; Krumbacher, K ; Doxiadis, I ; Ejima, H ; Templeton, J ; Albert, E.D ;Storb, R ; Deeg, H.J Joint report of the Third International Workshop of Canine Immunogenetics.II.Analysis of the serological typing of cells.*Transplantation* **43**,154-161.1987.
9. Deeg, H.J; Raff, R.F ; Grosse, W.H ;Bijma, A.M ;Buurman, W.A ; Doxiadis, I ; Kolb, H.J ; Krumbacher, K ; Ladiges, W ; Losslein, K.L ; Schoch, G ; Westbroek, D.L; Bull, R.W ; Storb, R ;Joint report of the Third International Workshop of Canine Immunogenetics I .Analysis of homozygous typing cells *Transplantation* **41**,111-117.1986.
10. Vriesendorp,H.M , Westbroek, D.L ; D' Amaro,J ; van der Does,J.A ; van der Steen,G.J ; van Rood, J.L ; Albert,E , Bernini, L ; bull,R.W ; Cabasson, J ; Epstein, R.B ; Erikson,V ; Feltkamp, T.E; Flad, H.D ; Hammer,C ; Lang,R ; Largiader, F ; Loringhoven K.V ; meera Khan, P ; Saison, R ; Serrou, B ; Schnappauf, H ; Swisher,S.N ; Templeton,J.W ; Uhlschmidt,G , Zweibaun A ,Joint report of 1st International Workshop on Canine Immunogenetics.*Tissue Antigens* **3**, 145-163.1973.
11. Vriesendorp,H.M ; Albert, E.D ; Templeton, J.W ; Belotsky, S ; Taylor, B ; Blumenstock, D.A; Bull ,R.W ; Cannon, F.D ; Epstein, R.B ; Ferrebee, J.W ; Grosse-Wilde, H ; Hammer, C ; Krumbacher, K ; Leon, S ; Meera,; khan,P ; Mickey, M.R ; Motolo, M ; Rapaport, F.T ; Saison,R ; Schnappauf,H ; Scholz, S ; Schroeder, M. L ; Storb, R ; Wank, R ; Westbroek, D. L ; Zweibaun, A ; Joint report of the Second International Workshop on Canine Immunogenetics.*Transplant Proc.* **8**, 289-314.1976.
12. Sarmiento,U.M ; Storb, R.F . Restriction fragment length polymorphism of the major histocompatibility complex of the dog.*Immunogenetics* **28**, 117-124 .1988.
13. Sarmiento,U.M ; Storb, R.F..Nucleotide sequence of a dog DRB cDNA clone.*Immunogenetics* **31**,396-399.1990.
14. Williamson, P ; Nicholas, F.W ; Stewart, G.J ; Restriction fragment length polymorphism analysis of canine II major histocompatibility complex genes.*Transplant Proc.***21**, 3751-3752. 1989
15. Kennedy ,LJ; L Alet; JM Angles; A Barnes ;SD Carter; O Francino ;JA Gerlach ;GM Happ; WE Ollier;A Polvi; W Thomson; JL Wagner.1999 Nomenclature for factors of the dog major histocompatibility system (DLA). First report of the ISAG DLA Nomenclature Committee.**54**:312-321. 1998.
16. Kennedy ,LJ ; SD Carter ; A Barnes ; S Bell ; D Bennett ; W E R Ollier ; W Thomson.Nine new dog DLA-DRB1 alleles identified by sequence-based typing.1998.
17. Kennedy ,LJ, SD Carter, A Barnes ,S Bell, D Bennett, B Ollier, W Thomson.Interbreed variation of DLA-DRB1,DQA1 alleles and haplotypes in the dog. **69**:101-111. 1999.
18. Kennedy, L J, S D Carter, A Barnes, S Bell, D Bennett, W E R Ollier, W Thomson. DLA-DQA1 polymorphisms in dog defined by sequence-specific oligonucleotide probes (SSOP). *Tissue Antigens* **55**:257-261. 2000.

19. Kennedy, L.J; L Halt; S carter ,A Barnest ; S Bell ;D Bennett;B Ollier W Thomson.Identification of further DLA-DRB1 and DQA1 alleles in the dog.**27**:25-28.2000.
20. Kennedy L. J ; Barnes A ; Happ G.M ; Quinnell R. J ; Bennet D ; Angles J.M ; Day M.J ; Carmichael N ; Innes J.F ; Isherwood D ; Carter S.D ; Thomson W ; Ollier W.E.R. Extensive interbreed,but minimal intrabreed,variation of DLA class II alleles and haplotypes in dogs.2002
21. Lewin,H.A ; Bernoco, D ; Evidence for BoLA –Linked resistance and susceptibility to subclinical progression of bovine leukemia virus infection.*Animal genetics* :**16**.197-207.1986
22. Maillard JC;Chantal I; ;Molecular Immunogenetics in Suceptibility to Bovinne dermatophilosis 2002.
23. Nagaoka,Y ; Kabeya,Y ; Onuma,M ; Kasai, N ; Okada, K ; Aida, Y ;Ovine MHC Class II DRB1 allele Associated with Resistance or Suceptibility to Development of Bovine Leukemia Virus-induced Ovine Lymphoma.*Cancer research* **59**:975-981.feb 15 1999.
24. Tiwari,Jl ; Terasaki,P.I ; HLA and Disease Associations.Spinger-verlag, New York.1985
25. Wagner JL ; Burnett RC ; DeRose SA ; Storb R ;Molecular analysis and polymorphism of the DLA-DRB1 gene .*Tissue Antigen* 1996 ;**48**:554-61.
26. Schneider S.,Arlequin version.A Software for Population Genetic Data Analysis. University of Geneva ,Switzerland.2000.
27. Cañon J., P. Alexandrino, I. Bessa,C. Carleos, Y. Carretero, S. Dunner, N. Ferran, D. Garcia, J. Jordana, D. Laloe, A. Pereira, A. Sanchez, K. Moazami-Goudarzi, Genetic diversity measures of local European beef cattle breeds for conservation propose, *Gen. Sel. Evol.* 33 (2001) 311-332.
28. Martinez A.M., J.V. Delgado, A. Rodero, J.L. Vega-Pla, Genetics structure of the Iberian pig breed using microsatellite. *Anim. Genet.* 31(2000) 295-301.
29. Cañon J., M.L. Checa, C. Carleos, J.L. Vega-Pla, M. Vallejo et al., The genetic structure of Spanish Celtic horse breeds inferred from microsatellite data, *Anim. Genet.* 31 (2000) 39–48.
30. Parker H.G., L.V. Kim , N.B. Sutter, S. Carlson, T.D. Lorentzen, T.B. Malek, G.S. Johnson, H.B. DeFrance, E.A. Ostrander, L. Kruglyak, Genetic Structure of the Purebred Domestic Dog, *Science* 304 (2004) 1160-1164.
31. J.L. Wagner Cellular, serological, and molecular U.M. Sarmiento polymorphism of the class I and class II loci R. Storb of the canine Major Histocompatibility Complex. *Tissue Antigens* 2002 59 205-210
32. Hill Adrian VS ,Genetics and genomics of infectious disease susceptibility *British Medical Bulletin* 1999;**55** (No. 2)

Figura 1. Canino macho de seis meses con demodicosis localizada.

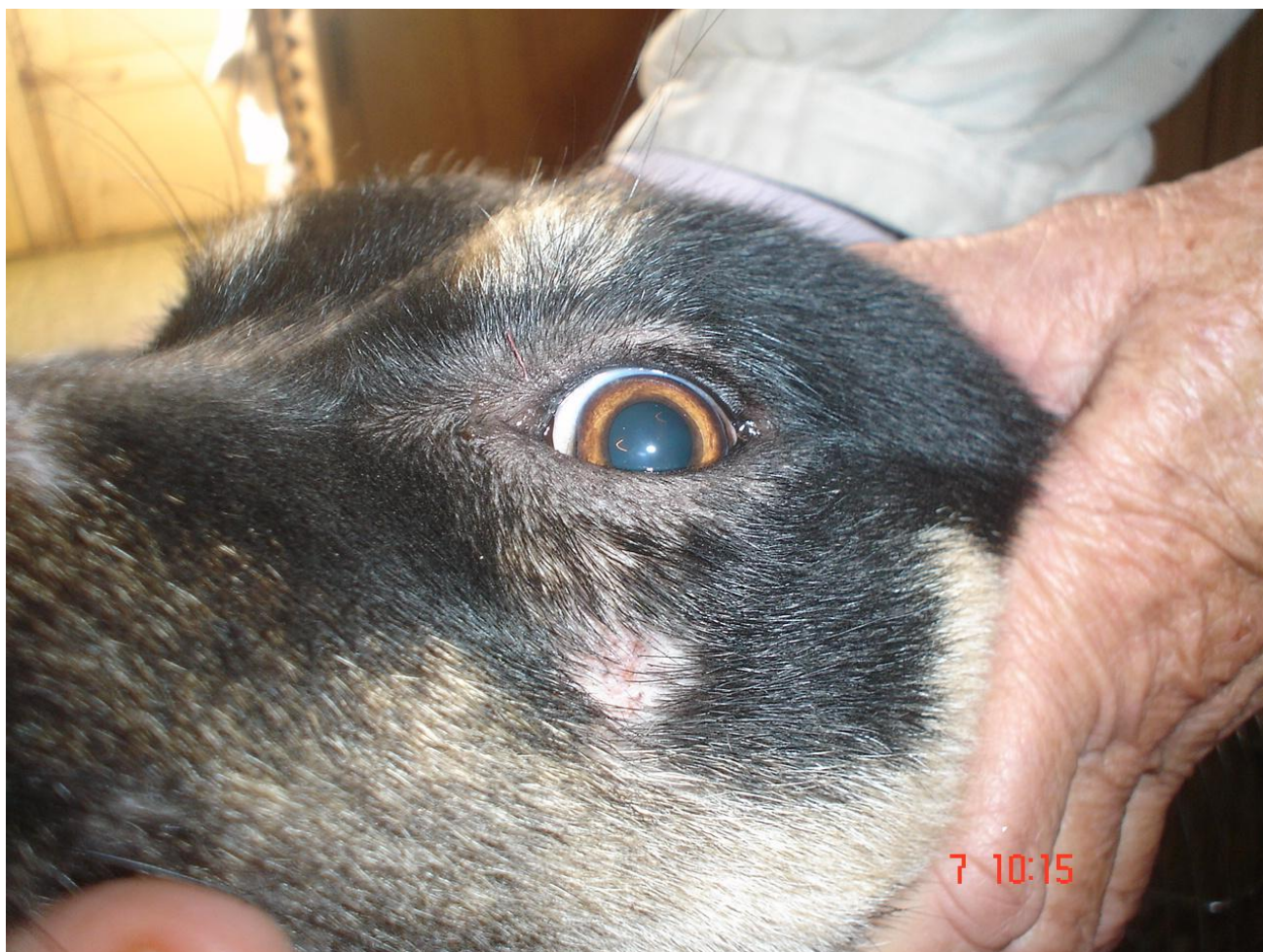


Figura 2. Canino boxer macho con demodicosis juvenil generalizada.



Figura 3. Observación microscópica del ácaro *Demodex canis*.



Figura 4. Representación esquemática del Complejo Principal de Histocompatibilidad (MHC) en perros (*Dog Leukocyte Antigen System, DLA*).

Figura 5. Molécula de Clase II del MHC.

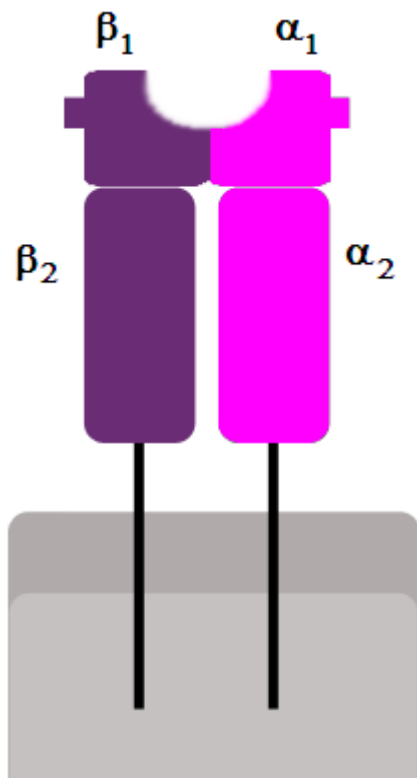


Figura 6. Genotipificación del microsatélites de clase I *FH2200*, mediante un secuenciador de ADN (MegaBace 1000, General Electric).

