

MARINA MITIE DE SOUZA MONOBE

**DIAGNÓSTICO MOLECULAR DA ALTERAÇÃO MUTAGÊNICA  
*MDR1 nt 230 (del4)* NO GENE MDR1 EM CÃES.**

Trabalho de Conclusão de Curso de Graduação apresentado  
À Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade  
“Julio de Mesquita Filho”, Campus Botucatu, SP,  
para obtenção do grau de médico veterinário

Preceptor: Prof. Adj. Dr. Antônio Carlos Paes

Botucatu  
2011

MARINA MITIE DE SOUZA MONOBE

**DIAGNÓSTICO MOLECULAR DA ALTERAÇÃO MUTAGÊNICA  
*MDR1 nt 230 (del4)* NO GENE MDR1 EM CÃES.**

Trabalho de Conclusão de Curso de Graduação apresentado  
À Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade  
“Julio de Mesquita Filho”, Campus Botucatu, SP,  
para obtenção do grau de médico veterinário

Área de Concentração: Clínica Médica de Pequenos Animais

Preceptor: Prof. Adj. Dr. Antônio Carlos Paes

Coordenador de Estágios: Prof. Dra. Jane Megid

Botucatu  
2011

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.  
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP  
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: *ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE*

Monobe, Marina Mitie de Souza.

Diagnóstico molecular da alteração mutagênica nt 230 (del4) no gene MDR1 em cães / Marina Mitie de Souza Monobe. – Botucatu : [s.n.], 2011

Trabalho de conclusão de curso (bacharelado - Medicina Veterinária) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

Orientador: Antonio Carlos Paes

Capes: 50501062

1. Collies (Cão). 2. Diagnostico molecular. 3. Mutação (Biologia).

Palavras-chave: Collies; Diagnóstico molecular; Glicoproteína P; Mutação MDR1; PCR; Sensibilidade à ivermectina.

MONOBE, MARINA MITIE DE SOUZA. *Diagnóstico molecular da alteração mutagênica nt230 (del4) no gene MDR1 em cães*. Botucatu, 2011. 20p. Trabalho de conclusão de curso de graduação (Medicina Veterinária, Área de Concentração: Clínica Médica de Pequenos Animais) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”.

## RESUMO

A glicoproteína P (P-gp) é uma proteína transmembrânica ATP-dependente responsável pelo transporte de substâncias xenobióticas e múltiplas classes de drogas, muitas delas comumente utilizadas na medicina veterinária. Codificada pelo gene MDR1 ou ABCB1, localizado no cromossomo 14 de canídeos, é expressa em tecidos de excreção e secreção como fígado, rins e intestinos, a qual limita a absorção nos intestinos e promove a excreção pela bile e urina de seus substratos. Em 2001, uma mutação caracterizada pela deleção de 4 pares de bases (4pb) no gene MDR1 de cães foi identificada como MDR1-1 ▲, ABCB1-1 ▲ ou MDR1 MDR1 nt 230 (del4) e associada a formação de uma glicoproteína P afuncional. A correlação clínica para esta mutação é a (hiper)sensibilidade de certas raças de cães, principalmente collies, à algumas classes de drogas como agentes anticancerígenos (doxorrubicina, vincristina, vinblastina), imunossupressores (ciclosporina), antiparasitários (ivermectina, moxidectina), hormônios esteróides (aldosterona, cortisol, dexametasona), antimicrobianos (tetraciclina, doxiciclina, levofloxacina, cetaconazol, itraconazol), analgésicos (morfina, metadona), antidiarreicos (loperamida), antiepilépticos (fenotiazina), glicosídeos cardíacos (digoxina, diltiazem, verapamil, talinolol) entre outros. Cães homozigotos para a mutação (MDR1 -/-) apresentam maior predisposição à intoxicação com substratos da P-gp do que cães heterozigotos (MDR1 +/-) e estes apresentam maior predisposição do que cães homozigotos não mutantes (MDR1 +/+). Mediante a identificação da MDR1 nt 230 (del4), diversas técnicas moleculares foram desenvolvidas para a identificação de animais mutantes como método diagnóstico. A importância do diagnóstico molecular está em, a partir da identificação dos animais mutantes, estabelecer protocolos terapêuticos seguros, excluir esses animais de plantéis de criação (programa de seleção genética) e investigar histórico de reações adversas a fármacos. O objetivo principal deste estudo é realizar uma revisão bibliográfica sobre a MDR1 nt230 (del4) em cães com enfoque no diagnóstico molecular e na importância clínica.

**Palavras-Chave:** mutação MDR1, glicoproteína P, sensibilidade à ivermectina, collies, PCR, diagnóstico molecular

MONOBE, MARINA MITIE DE SOUZA. *Molecular diagnosis of MDR1 nt230 (del4) mutation in dogs*. Botucatu, 2011. 20p. Work for graduation (Veterinary Medicine Area of Concentration: Small Animal Internal Medicine) - Faculty of Veterinary Medicine, Campus Botucatu, Universidade Estadual Paulista "Julio de Mesquita Filho."

## **ABSTRACT**

P-glycoprotein is an adenosine triphosphate (ATP)-driven drug efflux carrier responsible for transport of xenobiotics and multiple classes of drugs, many usually use in veterinary medicine. Encoded by MDR1 gene, also referred to as ABCB1, located on chromosome 14, is expressed in many tissues with secretory or excretory functions, such as liver, kidney and intestine, where it limits drug absorption from the gut and promotes drug excretion into the bile and urine of their substrates. In 2001, a 4 base pair gene deletion mutation in the canine MDR1 gene was identified as MDR1-1▲, ABCB1-1▲, MDR1 MDR1 nt 230 (del4) and associated with a non-functional P-glycoprotein. The clinical correlation is the (hyper) sensitivity of certain dogs breeds, mostly collies, to a few classes of drugs such as anticancer drugs (doxorubicin, vincristine, vinblastine), immunosuppressants (cyclosporine), antiparasitic drugs (ivermectin, moxidectin), steroids hormones (aldosterone, cortisol, dexamethasone), antimicrobial agents (tetracycline, doxycycline, levofloxacin, ketoconazole, itraconazole), analgesics (morphine, methadone), antidiarrheals (loperamide), antiepileptic agents (phenothiazine), cardiac drugs (digoxin, diltiazem, verapamil, talinolol) and others. Dogs with homozygous MDR1 nt 230 (del4) MDR1 mutations (MDR1 - / -) have a higher predisposition to intoxication with substrates of P-gp than heterozygous (MDR1 + / -) and these are more likely than dogs homozygous non-mutant (MDR1 + / +). After the identification of nt230 (del4) mutation, several molecular techniques have been developed for identification of mutant animals as a diagnostic method. The importance of molecular diagnosis is, after the identification of mutant animals, establish treatment protocols safe, exclude this animals from reproduction (genetic selection program) and investigating the history of adverse drugs reactions. The main objective of this study is a literature review on the MDR1 nt230 (del4) in dogs with a focus on molecular diagnostics and clinical importance.

**Keywords:** MDR1 mutation, P-glycoprotein, ivermectin sensitivity, collies, PCR, molecular diagnostics

# SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	6
2. GLICOPROTEÍNA P .....	7
2.1 ESTRUTURA E FUNÇÃO.....	7
2.2 FATORES QUE INFLUENCIAM NA EXPRESSÃO E ATIVIDADE .....	7
2.3 IMPACTO DA DIVERSIDADE GENÉTICA.....	8
3. MDR1 nt 230 (del 4) .....	8
3.1 IMPLICAÇÕES TERAPÊUTICAS .....	9
3.2 EPIDEMIOLOGIA <i>versus</i> PREDISPOSIÇÃO RACIAL.....	10
3.3 PREDISPOSIÇÃO A DOENÇAS .....	11
4. DIAGNÓSTICO MOLECULAR.....	12
4.1 PCR CONVENCIONAL.....	12
4.2 PCR ALELO ESPECÍFICO .....	13
4.3 RFLP / AFLP.....	13
4.4 PCR TEMPO REAL (qPCR) .....	13
4.5 HRM.....	14
4.6 SEQUENCIAMENTO .....	14
4.7 OUTRAS TÉCNICAS.....	15
5. IMPORTÂNCIA NO DIAGNÓSTICO .....	15
6. CONCLUSÃO.....	16
7. ANEXOS .....	17
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	18

## 1. INTRODUÇÃO

A Glicoproteína P (P-gp) é uma bomba de efluxo transmembrânica ATP-dependente codificada pelo gene MDR1 (*multi-drugs resistance*), também conhecido como ABCB1, e expressa na membrana canicular de hepatócitos, membrana luminal das células do túbulo contorcido proximal de néfrons, borda escovada de enterócitos, capilares testiculares, capilares da barreira hemato-encefálica, trofoblastos de placenta e células hematopoiéticas (Chaudhary & Roninson, 1991). A expressão apical nesses tecidos permite com que ela regule a distribuição e biodisponibilidade de seus substratos, limitando a absorção intestinal e promovendo a eliminação destes pela bile, urina e intestinos, além de restringir a entrada no sistema nervoso central (SNC) (Geyer et al., 2005).

A P-gp apresenta ampla especificidade de substratos que variam desde pequenas moléculas como cátions orgânicos, carboidratos, aminoácidos e alguns antibióticos até moléculas grandes como polissacarídeos e proteínas (Wang et al., 2003; Zhou, 2008) que englobam uma gama de drogas comumente utilizadas na medicina veterinária. São substratos da P-gp alguns agentes quimioterápicos, imunossuppressores, antiparasitários, hormônios esteróides, antimicrobianos, analgésicos, antidiarreicos, antiepilépticos, glicosídeos cardíacos, entre outros (Mealey et al., 2004).

Devido ao papel predominante da P-gp na disposição de diversas classes de drogas, mutações relacionadas a sua menor expressão alteram as propriedades farmacocinéticas, levando a maior biodisponibilidade oral e a redução da eliminação no fígado, rins e intestinos. Entretanto, a consequência clínica mais relevante é o efeito neurotóxico promovido pela disfunção da P-gp (Pulliam et al., 1985; Schinkel et al., 1994). Os sinais de neurotoxicidade incluem, principalmente, ataxia, salivação, depressão, midríase, letargia, coma, cegueira clínica, convulsões e decúbito (Mealey et al., 2004; Geyer et al., 2005; Geyer et al., 2007; Barbet et al., 2009).

Em 2001, uma mutação caracterizada pela deleção de 4 pares de bases (4pb) no gene MDR1 de cães foi identificada como MDR1-1▲, ABCB1-1▲ ou MDR1 nt 230 (del4) e associada a formação de uma glicoproteína P afuncional (Gramer et al., 2011). Essa mutação conserva-se durante as gerações passando-se identicamente para os descendentes, mostrando a importância de um processo de seleção genética nos animais (Mealey et al., 2008; Neff et al., 2004).

A partir disso, foram desenvolvidas diferentes técnicas moleculares para diagnóstico de rotina de cães que apresentam essa alteração genética. Estudos realizados através destes métodos moleculares em relação a frequência e origem da mutação mostraram que a mutação era inicialmente restrita a raças relacionadas a pastoreio como collie, border collie, pastor de shetland, pastor australiano, old english sheepdog e pastor inglês. Atualmente, outras raças de trabalho e companhia foram identificadas com o gene mutante como whippet, McNab, silken windhound, pastor alemão, pastor suíço e wäller, além de uma porcentagem variável de cães sem raça definida (Neff et al., 2004; Geyer et al., 2005; Baars et al., 2008; Mealey & Meurs, 2008;).

Trabalhos recentes mostram que alterações genéticas no gene MDR1 associado as alterações farmacocinéticas aumentam a predisposição a determinadas doenças no homem como a doença inflamatória intestinal crônica, também relatada em camundongos com deficiência de P-gp (Panwala et al., 1998). Em cães e camundongos mutantes, em condições de estresse ou mediante administração de dexametasona, sabe-se que a supressão no nível de cortisol plasmático devido a altas concentrações de

corticóides no hipotálamo levam a predisposição a doenças endócrinas como hipoadrenocorticismo (Mealey et al., 2004; Dowling, 2006).

Além disso, considerando a ampla abrangência de drogas substratos da P-gp e o alto risco de intoxicação de cães mutantes, recomenda-se um programa de genotipagem associado a estudos clínicos a fim de estabelecer protocolos terapêuticos seguros de modo a prevenir reações adversas, investigar possíveis históricos de intoxicação e retirar de plantéis de reprodução animais portadores de alelos mutantes.

## **2. GLICOPROTEÍNA P**

A primeira descrição da existência da P-gp foi em 1976, em células do ovário de hamster chinês selecionadas em cultivo celular devido à característica de resistência a colchicina e alguns quimioterápicos (Juliano & Ling, 1976). Em 1980, o gene que codifica a proteína foi descoberto e nomeado “gene de multiresistência a drogas” (*multi-drugs resistance*- MDR), devido a superexpressão em células cancerígenas conferir resistência do tumor a drogas quimioterápicas (Ueda et al., 1987). Desde então, diversas linhas de pesquisa relacionadas a essa proteína foram desenvolvidas para entender os mecanismos farmacocinéticos e sua importância nos diversos tipos de protocolos terapêuticos.

### **2.1 ESTRUTURA E FUNÇÃO**

Glicoproteína P é uma proteína transmembrânica glicosilada de 1280 aminoácidos, 170 kDa pertencente a superfamília de transportadores ABC ATP-dependentes (bomba ATP-dependente). Formada por dois tipos de sítio de ligação: um com característica hidrofóbica, tendo alta afinidade por substratos lipossolúveis e anfipáticos como drogas/toxinas e xenobióticos e outro onde ocorre a ligação e hidrólise de ATPs. É através da energia liberada no processo de ligação e hidrólise de ATPs que ocorre a mudança de conformação da proteína, permitindo a translocação do substrato do meio intra para o extracelular (Mealey et al, 2004; Geyer et al.,2005; Martinez et al., 2008; Zhou, 2008).

O papel fisiológico da P-gp envolve o efluxo de componentes hidrofóbicos gerados do metabolismo intracelular ou xenobióticos encontrados no meio extracelular para serem devidamente excretados, funcionando como mecanismo de proteção do organismo a essas substâncias (Mealey, 2004).

### **2.2 FATORES QUE INFLUENCIAM NA EXPRESSÃO E ATIVIDADE**

A atividade da glicoproteína P pode ser modulada por diversos fatores como a N-glicosilação que, quando inibida parece reduzir a atividade da bomba protéica (Kramer et al., 1995) e a fosforilação de aminoácidos residuais da P-gp, mediada pela kinase C que afeta o transporte de substratos (Idriss et al., 2000). Além disso, outro fator endógeno também envolvido é a cascata inflamatória, pois envolve elementos como endotelina e óxido nítrico (NO) que reduzem a atividade. Por conta disso, agentes externos que ativam a resposta inflamatória são também responsáveis pela modulação como agentes de contraste, aminoglicosídeos e metais pesados.

É interessante considerar que existe uma relação entre NO e a ciclooxigenase 2 (COX-2). Estudos indicam que a expressão de COX-2 aumenta a presença de NO de modo a reduzir a atividade da bomba (Tsatsanis et al., 2006; Martinez et al., 2008).

Existem inúmeros excipientes e substâncias naturais que podem alterar a atividade protéica. Flavonóides encontrados em frutas e vegetais e a vitamina E e seus



derivados, diminuem a atividade da P-gp. Exemplos de excipientes não iônicos que interagem com a bomba e modulam sua atividade são: Tween 80, triton X-100, ciclodextrina hidrofílica, PEG-300, PEG-400, entre outros. Acredita-se que os excipientes, em sua maioria, alteram a fluidez da membrana celular provocando alteração da capacidade de reconhecimento, ligação e transporte dos substratos (Martinez et al., 2008; Collnot et al., 2007).

A regulação da expressão do gene MDR1 é complexa e pouco se sabe sobre o assunto. Entretanto, sabe-se que o aumento da expressão gênica provoca maior transcrição protéica e o conseqüente aumento na atividade da P-gp. Além disso, um grande número de xenobióticos, choque térmico, radiação UV, entre outros, parecem induzir a expressão (Hennessy & Spiers, 2007).

### 2.3 IMPACTO DA DIVERSIDADE GENÉTICA

Pesquisas realizadas com o gene MDR1 em humanos demonstraram que este é um gene polimórfico e apresenta um número variado de polimorfismos dependendo da etnia (Zhou, 2008). Por exemplo, em caucasianos foram descobertos 15 tipos de polimorfismos e destes, doze não alteram a seqüência protéica, sendo, portanto, mutações silenciosas. Essas mutações silenciosas ocorrem em íntrons próximos a exons terminais que não alteram a posição de aminoácidos (Hoffmeyer et al., 2000).

Vários tipos de polimorfismos conhecidos em humanos são responsáveis pela deformação e disfunção da P-gp, predispondo os indivíduos a intoxicações e diversas doenças. A deformação da estrutura da bomba pela adição, substituição ou deleção de um único aminoácido já é suficiente para induzir doenças em humanos e animais (Zhou, 2008; Han et al., 2010).

Assim, como em humanos, um estudo recente em cães da raça border collie sugeriu a possibilidade de que ocorra padrões de polimorfismos em cães de diferentes raças, além de uma nova mutação que provoque a hipersensibilidade à administração de fármacos substratos da glicoproteína P (Han et al., 2010). Neste novo tipo de mutação, ocorre uma inserção de 3 pares de bases na posição nucleotídica 72-73. Os mesmos autores identificaram apenas uma mutação no gene MDR1. Esta mutação será descrita no próximo tópico deste trabalho.

### 3. MDR1 nt 230 (del 4)

O gene MDR1 em cães está localizado no cromossomo 14 composto por 28 exons. A mutação MDR1 nt 230 (del4) é uma deleção de 4 pb no quarto exon provocando a formação de múltiplos *stop codons* prematuros que resultam em uma glicoproteína P trincada não funcional (Mealey et al., 2001).

A principal correlação clínica a essa mutação é o fenótipo de sensibilidade a ivermectina relatada desde 1983 em cães da raça collie (Seward, 1983; Pulliam et al., 1985).

Pesquisas realizadas mostraram que a mutação originou-se no Reino Unido em *sheepdogs* (cães de pastoreio) antes de 1873, quando as raças passaram a ser registradas. Desde então, sugere-se que a frequência alélica da mutação tem se reduzido ao longo do tempo devido às mudanças sócio-econômicas e culturais. Essas mudanças incluem a desvalorização de raças de pastoreio que passaram então a ser usadas para companhia e *dog show*, além da popularização e aparecimento de novas raças não relacionadas geneticamente aos “*sheepdogs* mutantes” (Neff et al., 2004).

A importância funcional da MDR1 nt 230 (del4) tem sido estudada em camundongos com deficiência de P-gp (homozigotos mutantes). Estes demonstraram ser saudáveis e férteis em condições laboratoriais, sem anormalidades anatômicas e com todos os parâmetros fisiológicos aceitáveis para a espécie, de modo que não é necessário o tratamento medicamentoso para a mutação. Entretanto, pesquisas envolvendo administração de diversas classes de fármacos como ivermectina mostraram que os camundongos mutantes apresentam aumento das concentrações basais e intracerebrais desses fármacos em mais de 10x do valor encontrado em camundongos não mutantes (Schinkel et al., 1994). Estudos posteriores comprovaram que o mesmo que ocorre em camundongos também ocorre em cães e humanos com deficiência de P-gp.

### 3.1 IMPLICAÇÕES TERAPÊUTICAS

A atividade da glicoproteína P afeta a concentração de drogas nos tecidos e, portanto, na efetividade e segurança. Sua super regulação causa falhas no tratamento ao câncer, sendo de grande relevância na área de oncologia (Martinez et al., 2008; Zhou, 2008).

No caso da mutação MDR1 nt 230 (del4), ocorre uma baixa regulação, ou melhor, uma menor quantidade de P-gp funcionante no organismo, implicando em maior sensibilidade a diversos fármacos substratos da P-gp, sendo uma grande maioria, de importância na medicina veterinária.

Estudos demonstraram que devido à expressão da P-gp em enterócitos, esta altera a biodisponibilidade de fármacos administrados por via oral. De fato, quando testou-se a administração de fármacos substratos da P-gp após a administração de seus inibidores, o pico de concentração plasmática destes fármacos subiu variando em mais de 3x o pico que ocorre em condições normais (Sparrebom et al., 1997; Lown et al., 1997; Schwarz et al., 1999; Bouer et al., 1999; Wandel et al., 2002; Yamagushi et al., 2002). Portanto, sugere-se que o mesmo ocorra em cães com gene mutante, na qual a funcionalidade da bomba é baixa.

Ultimamente os substratos da P-gp podem ser classificados em 2 grupos: (i) tipo vimblastina, da qual a absorção intestinal sofre grande influência pela bomba e (ii) tipo verapamil, da qual a absorção intestinal não é influenciada. No caso das drogas tipo vimblastina, estas apresentam baixa permeabilidade a membrana citoplasmática e alta afinidade a glicoproteína, enquanto que, as drogas tipo verapamil apresentam alta permeabilidade e afinidade (Ogihara et al., 2006). Em estudo realizado por Ogihara et al (2006), conclui-se que drogas com alta afinidade e permeabilidade a membrana apresentam menores taxas de absorção oral do que drogas com baixa permeabilidade e alta afinidade.

Além de alterar a absorção de medicamentos dados por via oral, a P-gp altera também a distribuição de drogas pelo organismo. Em relação a isso, experimentos realizados com camundongos homozigotos mutantes (MDR1 -/-) demonstraram que a bomba atua principalmente na distribuição de drogas em cérebro, testículos e feto, como limitante fisiológico em barreiras (barreira hematoencefálica, barreira testicular e placenta) (Schinkel et al., 1995). Estes estudos *in vivo* mostraram que a glicoproteína atua transportando substâncias destes tecidos de volta à circulação, não permitindo com que alcancem altas concentrações.

No caso dos animais portadores da mutação, essas concentrações se elevam, principalmente no SNC, demonstrando os sinais típicos de intoxicação como salivação, depressão respiratória, depressão, decúbito, convulsões, midríase, letargia, cegueira

clínica, tremores, coma, morte. Sinais estes que foram descritos desde 1983 com relatos de intoxicação de collies com ivermectina, um dos substratos da P-gp que encontra-se em altas concentrações cerebrais em animais com gene mutante (Seward, 1983).

Em adição à ivermectina, outra gama de drogas se mostram elevadas no SNC. Estas podem ser classificadas como: agentes quimioterápicos (doxorubicina, vincristina, vinblastina), imunossupressores (ciclosporina), antiparasitários (ivermectina, moxidectina), hormônios esteróides (aldosterona, cortisol, dexametasona), antimicrobianos (tetraciclina, doxiciclina, levofloxacina, cetaconazol, itraconazol), analgésicos (morfina, metadona), antidiarreicos (loperamida), antiepilépticos (fenotiazina), glicosídeos cardíacos (digoxina, diltiazem, verapamil, talinolol), entre outros (Mealey et al., 2004; Baars et al., 2008). A relação completa de drogas até hoje descobertas substrato da P-gp e envolvidas na medicina veterinária estão presentes na tabela 1.

Devido à bomba ser expressa também em néfrons e canalículos biliares, envolve-se também na excreção de seus substratos. A administração de inibidores da P-gp em ratos demonstrou menores taxas de excreção em urina e bile de doxorubicina, digoxina e vincristina (Kiso et al., 2000).

Fatores endógenos e exógenos que influenciam a atividade da bomba, também alteram a excreção de seus substratos. Sabe-se que processos inflamatórios e artrites severas podem reduzir a excreção de drogas pelos rins e fígado, mas não alteram a funcionalidade da bomba em enterócitos (Martinez et al., 2008).

A alteração renal e biliar em cães de pastoreio com mutação, parece apresentar importante papel no aumento da sensibilidade destes a determinadas drogas quimioterápicas. Por exemplo, sabe-se que collies com linfoma tratados com doxorubicina ou vincristina desenvolvem, mesmo em baixas doses, mielossupressão e gastroenterite, mas toleram, mesmo em altas doses, tratamentos com ciclofosfamida (Mealey et al., 2004).

Portanto, devido ao papel predominante da glicoproteína P na disposição de drogas, as mutações relacionadas a expressão do gene MDR1, alteram as propriedades farmacocinéticas, levando a maior biodisponibilidade oral e a redução nas taxas de eliminação renal e hepática, predispondo ainda mais a evolução de quadros de intoxicação tão relatados nestes cães (Geyer et al., 2005).

### **3.2 EPIDEMIOLOGIA *versus* PREDISPOSIÇÃO RACIAL**

Ao longo dos últimos anos, diversas pesquisas em diferentes países do mundo foram realizadas a fim de identificar a porcentagem do alelo mutante MDR1 nt 230 (del4) em diferentes populações de cães, como mostra a tabela 2 que resume alguns dos estudos realizados.

Por muito tempo, a mutação MDR1 MDR1 nt 230 (del4) foi associada com a sensibilidade a ivermectina e, principalmente, a cães da raça collie ou cães dolicocefálicos. Entretanto, atualmente sabe-se que a mutação ocorre não apenas em raças pertencentes a árvore genealógica dos collies como também em outras raças, inclusive galgos e cães sem raça definida.

Neff et al (2004) exploraram a presença dessa mutação em raças da árvore genealógica de collies e identificaram a presença em sete raças (collie, border collie, old english sheepdog, pastor de shetland, McNab, pastor australiano, pastor inglês) e a ausência desta mutação em outras quatro raças (australian cattle dog, kelpie, bearded collie, welsh sheepdog), que apresentam igual sensibilidade a ivermectina. A partir

destes resultados, levantou-se a hipótese de que essas outras raças com ausência da mutação ou apresentam o alelo mutante em baixa frequência ou existe a possibilidade de que outra mutação ocorra, permitindo a sensibilidade a ivermectina nesses animais.

A presença relatada do alelo mutante em cães da raça silken windhound e whippet em alguns estudos, levantou a hipótese de que ambas foram resultado de um cruzamento com pastores de shetland para desenvolver o fenótipo de pelagem por volta de 1980. Atualmente a variação do alelo mutante nestas raças varia de 58 à 75% no whippet e 31 à 34% no silken windhound (Neff et al., 2004; Mealey et al., 2008; Gramer et al., 2011).

Outras três raças de pastoreio com presença do alelo mutante identificada, porém não relacionadas com a árvore genealógica de collies são pastor alemão, pastor suíço e wäller (Geyer et al., 2005; Erkens et al., 2009; Mealey et al., 2008; Gramer et al., 2011). Acredita-se que a raça wäller se estabilizou na Alemanha por volta de 1994 e apresenta como uma das raças de sua origem o pastor australiano, de modo a justificar a presença na MDR1 MDR1 nt 230 (del4) (Geyer et al., 2005).

Entretanto, a presença do alelo mutante nas raças pastor alemão e pastor suíço ainda é contraditória e variam de 0 à 10% em pastores alemães e 20 à 25% em pastores suíços. Estudo com uso de microsátélites em pastores suíços mutantes sensíveis a doramectina (substrato da P-gp como a ivermectina), demonstrou que a mesma mutação de collies ocorre em pastores suíços, porém o haplótipo dos pastores é consistente com uma recente introgressão assim como ocorre na raça whippet. Deste modo, pressupõe-se que o pastor suíço tenha adquirido a mutação de alguma linhagem recente na história e que o imbreeding possa ter ocasionado a homozigose mutante (Geyer et al., 2007).

Pesquisas mais recentes tem direcionado a atenção a cães sem raça definida que apresentaram variação do alelo de 3 à 11%, mostrando sua importância no diagnóstico (Mealey et al., 2008). Entretanto, a grande importância no diagnóstico molecular ainda se concentra nas raças da árvore genealógica de collies, na qual a presença da mutação (-/- ou +/-) chega a variar de 74 à 88% nas collies, 0,4 à 75% nos pastores de shetland, 31 à 60% nos pastores australianos, 0 à 2% nos border collies, 2,5 à 14% nos old english sheepdogs e de 0 à 30% nos McNab (Neff et al., 2004; Gramer et al., 2011; Mealey et al., 2005; Mealey et al., 2008; Hugnet et al., 2004; Erkens et al., 2009; Kawabata et al., 2005). Essa alta porcentagem de animais com o alelo mutante justifica a necessidade da realização do diagnóstico nestas raças para estabelecimento de protocolos terapêuticos seguros.

Nos diferentes países onde o levantamento da presença do alelo MDR1 MDR1 nt 230 (del4) foi identificado, a ocorrência na maioria das raças foi semelhante provavelmente porque filogeneticamente a mutação é muito antiga e ocorreu antes das linhagens de raças se separarem.

### **3.3 PREDISPOSIÇÃO A DOENÇAS**

Atualmente existe a hipótese de que animais com deficiência de glicoproteína P apresentem alterações farmacocinéticas capazes de predispô-los a determinadas doenças, uma vez que a baixa função da P-gp potencializa a intoxicação a toxinas e xenobióticos endógenos e exógenos (Geyer et al., 2005).

Sabe-se que humanos com determinados tipos de polimorfismos no gene MDR1 apresentam maior susceptibilidade a doenças como: tumor epitelial renal, nefropatia endêmica, Parkinson, câncer de mama, doença inflamatória intestinal, artrite reumatóide e colite ulcerativa. Estudos com humanos com polimorfismo no gene MDR1

apresentando Parkinson demonstraram que a possível vulnerabilidade ocorre devido à concentração de potenciais xenobióticos no SNC (Martinez et al., 2008; Geyer et al., 2005).

A doença inflamatória intestinal também foi descrita em camundongos com MDR1 (-/-) sem outros patógenos, como doença espontânea. Acredita-se que a P-gp é responsável também pela proteção do organismo a toxinas bacterianas intestinais (Panwala et al., 1998). Entretanto, ainda são necessários estudos clínicos e moleculares associados para verificar se cães com alelo mutante são mais sensíveis a doenças inflamatórias intestinais, apesar que sabe-se que animais com super expressão da P-gp são refratários ao tratamento com imunossuppressores nesta doença (Martinez et al., 2008).

Estudos com collies e camundongos demonstraram que a regulação de glicocorticóides/ corticosteróides no cérebro é realizada pela glicoproteína P de modo que, em condições de estresse ou na administração de baixas doses de dexametasona, ocorre supressão do nível de cortisol plasmático devido às altas concentrações deste no SNC. Há evidências que collies MDR1 (-/-) apresentem supressão contínua do eixo hipotálamo-hipófise, levando a presença de síndromes Addisonianas atípicas quando estressados ou doentes ou na suplementação de corticóides exógenos (Mealey, 2004; Dowling, 2006).

Até o momento não existem trabalhos publicados provando a relação entre a mutação MDR1 nt 230 (del4) e a predisposição a determinadas doenças em cães.

#### **4. DIAGNÓSTICO MOLECULAR**

O diagnóstico molecular é um emergente campo na área de análises clínicas laboratoriais que consiste na pesquisa do material genético em amostras clínicas, detectando infecções e/ou doenças, sejam elas genéticas ou adquiridas, além de alterações no genoma como presença ou ausência de genes, seqüências de bases nitrogenadas ou mutações, que interfiram nas atividades fisiológicas do organismo.

Uma ampla variação de técnicas são utilizadas para a identificação de doenças genéticas. Todos os métodos apresentam vantagens e desvantagens, além de requerer considerável habilidade e experiência. Não existe uma padronização ou preferência geral por um método, mas os laboratórios devem ser conhecedores das limitações e sensibilidade dos métodos por eles usados (Cabello, 2011).

As técnicas mais comuns de diagnóstico molecular são: (i) amplificação enzimática do DNA (reação em cadeia pela polimerase -PCR) (ii) digestão da fita de DNA genômico ou produto de PCR com enzimas de restrição (iii) separação eletroforética do DNA ou do produto de PCR (iv) hibridação do DNA ou fragmentos de PCR com sondas oligonucleotídicas (Cabello, 2011).

O resumo a seguir é uma síntese das diferentes estratégias utilizadas para o diagnóstico da mutação nt230 (del4).

##### **4.1 PCR CONVENCIONAL**

A reação em cadeia pela polimerase (PCR) é uma técnica de biologia molecular, extremamente sensível que permite a amplificação enzimática e detecção das seqüências de ácidos nucléicos específicos da cadeia de DNA, catalisada por uma enzima, em geral a *Taq* polimerase, originada da bactéria *Thermus aquaticus*. Os produtos da amplificação podem ser visualizados pela adesão de moléculas fluorescentes intercalantes de nucleotídios (ex. brometo de etídio) entre as pontes de hidrogênio e

registrados em gel de agarose, acrilamida ou poliacrilamida (PAGE). Com o avanço nas pesquisas, desenvolveram-se variações nas técnicas de PCR.

Os trabalhos publicados utilizando a técnica convencional de PCR para diagnóstico da MDR1 nt 230 (del4) revelavam os produtos da amplificação em PAGE devido a esta técnica conseguir uma melhor separação e visualização das bandas indicativas de uma sequência de mutação e uma íntegra (Geyer et al., 2005; Neff et al., 2004; Roulet et al., 2003). Nestes trabalhos, é possível a discriminação alélica através do tamanho do produto amplificado, na qual homozigotos mutantes apresentam uma única banda de 134pb, homozigotos não mutantes uma única banda de 138pb e heterozigotos duas bandas, sendo uma de 138pb e outra de 134pb.

#### **4.2 PCR ALELO ESPECÍFICO**

Mutações conhecidas podem ser identificadas pelo desenho de três primers, um específico para o alelo mutante, o outro específico para o alelo selvagem (não mutante) e o terceiro é específico da região flangeadora (conservada) do exon e que será o primer que vai encaminhar a amplificação da fita no sentido direto. O desenho é realizado de maneira que o primer específico para o alelo mutante termine com a base mutada na extremidade 3' e o primer específico para o alelo selvagem termine com a base normal em sua extremidade 3', funcionando como uma sonda alelo específica. Este método é usado para detectar mutações específicas e foi chamado de sistema de amplificação de mutação refretária (teste de ARMS) (Cabello, 2011).

Baars et al. (2008) desenvolveu pela primeira vez a técnica para diagnóstico de rotina da mutação MDR1 nt 230 (del4) e provou ser esta uma ferramenta rápida para determinação dos genótipos de MDR1 usando amostras de sangue ou swabs bucais de cães. Em seu trabalho relata ser uma técnica específica, robusta, alternativa, acurada e, principalmente, econômica quando comparada a outras técnicas como qPCR.

#### **4.3 RFLP**

A RFLP (análise do polimorfismo de comprimento do fragmento de restrição) é uma técnica mediada por enzimas de restrição (endonucleases bacterianas), que catalisam a hidrólise de uma ligação fosfodiéster em um ácido nucléico. Porém, as nucleases de restrição cortam somente o DNA em sítios específicos, determinados por uma curta sequência de nucleotídeos (Alberts et al., 2002). Pode ser associada ou não a PCR, clivando os produtos amplificados.

Especificamente para o gene MDR1, esta técnica foi usada para determinação da frequência alélica em diversas raças de cães, apresentando como produtos finais uma sequência de 148pb para o alelo selvagem e 144pb para o alelo mutante (Hugnet et al., 2004; Mealey et al., 2005).

A principal vantagem desta técnica é a alta especificidade, visto que as enzimas somente clivarão a região complementar a ela, sendo importante nas questões de genotipagem e identificação de mutações. Entretanto, torna-se uma técnica custosa já que as enzimas apresentam alto custo e podem ser inativadas com variações de temperatura.

#### **4.4 PCR EM TEMPO REAL (qPCR)**

A técnica de PCR em tempo real (realtime-PCR ou qPCR), tem provado ser útil em várias aplicações, incluindo detecção de patógenos, expressão e regulação de genes, quantificação e discriminação alélica (Albertis et al., 2002). Portanto, é comumente

usado na genotipagem de rotina de SNPs e inserções ou deleções de nucleotídeos. Esta técnica consiste na utilização de oligonucleotídeos espécie- ou gênero-específicos, somado a utilização de um fluoróforo intercalante de dupla fita de ácido nucléico (sistema SYBR Green) ou de sondas fluorescentes (sistema TaqMan).

Atualmente, trabalhos com P-gp tem sido realizados com o sistema TaqMan (Klitzsch et al., 2010, Gramer et al., 2011) e SYBR Green (Erkens et al., 2009), com resultados satisfatórios. Klitzsch et al. (2010) padronizaram a discriminação alélica da MDR1 pelo sistema TaqMan, comprovando ser um método confiável, específico, prático, rápido, seguro (não utiliza produtos cancerígenos como brometo de etídio e PAGE) e com menor propensão a erros que o gel de eletroforese. Além disso, a identificação de deleções de poucas bases, como é o caso do nt230 (del4), é comprometida na PCR convencional associada a gel de eletroforese (principalmente de agarose), visto que ao visualizar no gel de agarose, a diferença entre as bandas de uma sequência mutada e uma íntegra, é praticamente imperceptível; no entanto, na qPCR a identificação é perceptível pela variação do  $C_T$  (ciclo do threshold). Um exemplo foi Gramer et al. (2011) que utilizaram a qPCR, sistema TaqMan, como uma ferramenta para genotipar amostras de cães na rotina diagnóstica, identificando a predisposição da mutação para determinadas raças.

#### 4.5 HRM

HRM (*high resolution melting*) é um método de análise pós-qPCR usado para identificação de variações genéticas em sequências de ácidos nucléicos (polimorfismos, mutações). Caracterizado por ser um método rápido e prático, baseia-se na análise da curva de dissociação (melting) e difere da qPCR por apresentar corantes mais fortes e em maiores concentrações, detecção mais sensível a fluorescência e um novo software que usa as informações de fluorescência para fornecer dados sobre a sequência nucleotídica (Applied Biosystems, 2011).

Este método permite classificar o indivíduo como homocigoto ou heterocigoto para um dado gene (mutante ou não) e por ser um método relativamente novo, desenvolvido em 2007, ainda não apresenta muitos estudos com cães. Entretanto em humanos mostrou-se uma técnica segura, prática, rápida e aplicável para análises genômicas, estando bem difundida em diversas pesquisas relacionadas a mutações (Gonzalez-Bosquet et al., 2011).

#### 4.6 SEQUENCIAMENTO

O sequenciamento do DNA consiste em uma série de métodos bioquímicos que têm como finalidade determinar a ordem das bases nitrogenadas adenina (A), guanina (G), citosina (C) e timina (T) da molécula de DNA, e baseia-se na interrupção da síntese da cadeia complementar pela adição de nucleotídeos modificados, chamados didesoxirribonucleotídeos, que impedem o crescimento de um fragmento de DNA em replicação pela DNA polimerase após sua adição (Roulet et al., 2003).

Esta técnica molecular é utilizada para se conhecer detalhadamente a sequência do ácido nucléico em estudo a fim de se identificar SNPs, mutações, homologias e identificação de agentes. O sequenciamento foi realizado na maioria dos trabalhos com MDR1 nt 230 (del4) como método confirmatório dos resultados obtidos por outras técnicas moleculares (Roulet et al., 2003; Neff et al., 2004).

#### 4.7 OUTRAS TÉCNICAS

Além das técnicas convencionais e suas variações já citadas, outras contribuem para a detecção da mutação no gene MDR1. Dentre elas são utilizadas atualmente o Western Blotting e o uso de microsátélites.

Neff et al (2004), utilizou a técnica de microsátélites para identificar a origem e idade alélica da mutação. É através da análise de halotipos indicada pelos microsátélites que pode-se dizer a origem da MDR1 nt 230 (del4). Halotipos diferentes em uma mesma subpopulação geográfica, que é o caso das collies, indica segregação prolongada da MDR1 nt 230 (del4), enquanto que a presença de baixo número de halotipos indica recente integração da mutação na raça estudada. Através do cálculo da frequência alélica (halotipos I e II) e distância entre *linkages*, é possível determinar há quantas gerações a mutação está presente em determinada população. No caso deste estudo, verificou-se que a mutação está presente nos cães entre 40 à 120 gerações. Contando que cada geração apresenta por volta de 4 anos, sugeriu-se que a mutação tenha surgido antes de 1873, quando houve o reconhecimento formal das raças no Reino Unido. O uso de microsátélites também foi descrito para identificar a origem da mutação em raças que não pertencem a linhagem dos collies, como o pastor suíço (Geyer et al., 2007).

A técnica de Western Blotting baseia-se na detecção de proteínas em tecidos triturados ou extratos de tecidos biológicos e foi utilizada em alguns trabalhos com P-gp como complemento confirmatório dos resultados obtidos na PCR. Nela observou-se que animais com alelo mutante apresentavam baixa ou nula expressão da P-gp (Neff et al., 2004; Roulet et al., 2003).

Conforme o avanço nas pesquisas com MDR1, espera-se que novas técnicas moleculares sejam desenvolvidas e padronizadas para acrescentar o conhecimento sobre a farmacogenética e fisiopatogenia relacionadas à MDR1 MDR1 nt 230 (del4).

#### 5. IMPORTÂNCIA NO DIAGNÓSTICO

Atualmente é evidente que a atuação da glicoproteína P pode influenciar na concentração e resposta terapêutica de diversas drogas, de modo que torna-se impossível ignorar o potencial impacto que a variação gênica individual pode trazer como consequência (Martinez et al., 2008).

Polimorfismos no gene MDR1 podem causar maior ou menor resistência a drogas, dependendo do tipo de mutação. Sabe-se que em humanos, variações no polimorfismo aumentam a predisposição a diversas doenças e o mesmo foi verificado em camundongos com doença inflamatória intestinal (Geyer et al., 2005). Em cães com alelo mutante ainda são necessários que novos estudos associando o diagnóstico molecular e o acompanhamento clínico sejam desenvolvidos para verificar se a mesma predisposição às doenças ocorre.

No caso da mutação MDR1 nt 230 (del4), foram verificadas altas taxas de concentração plasmática e intracerebral e menores taxas de concentrações em urina e bile de determinadas drogas, todas substrato da P-gp (Mealey, 2008). Essa variação nas concentrações predispõe os indivíduos mutantes a intoxicação e riscos de efeitos colaterais, podendo leva-los a morte. É provável que um número elevado de reações adversas sejam cada vez mais relatadas e associadas a mutação, à medida que forem descobertos mais substratos da bomba.

A genotipagem é importante não apenas para seleção de protocolos terapêuticos, mas também para determinação da dose dos fármacos e na investigação de históricos de intoxicações, uma vez que alguns tipos de substratos são tóxicos apenas acima de



concentrações recomendadas (Erkens et al., 2009). Além disso, sabe-se que cães homozigotos mutantes (-/-) são mais suscetíveis a intoxicação do que cães heterozigotos (+/-) e estes mais suscetíveis do que cães não mutantes (+/+) (Dowling, 2006).

A MDR1 nt 230 (del4) encontra-se altamente difundida em cães da raça collie, pastor de shetland, pastor australiano, old english sheepdog, McNab, whippet, silken windhound e pastor suíço, de modo que indica a necessidade da realização de um diagnóstico molecular prévio à implantação de protocolos terapêuticos a fim de reduzir taxas de intoxicação e de efeitos colaterais nesses animais (Mealey & Meurs, 2008; Erkens et al., 2009; Gramer et al., 2011).

Por conta disso, na Alemanha e nos EUA, estabeleceu-se a necessidade de se checar o genótipo MDR1 em raças predispostas antes do tratamento, como triagem terapêutica (Klitzsch, et al., 2010).

Além disso, devido à mutação ser identicamente expressa em descendentes, torna-se também importante a identificação de animais com alelo mutante para retirada de criações e aprimoramento dessas raças (programa de seleção genética) (Neff et al., 2004).

Apesar das desvantagens existentes em animais mutantes, a condição de ser mutante pode representar também benefícios aos próprios animais. Indivíduos mutantes com tumores testiculares e cerebrais respondem melhor ao tratamento a quimioterapia do que os indivíduos não mutantes. Isso foi verificado em ratos com tumor de glioblastoma implantado no cérebro e tratado com valspodar associado ao inibidor da P-gp que resultou em redução de 90% da massa tumoral (Fellner et al., 2002). Além disso, quimioterápicos que apresentam baixa biodisponibilidade quando administrados por via oral e que em pacientes normais devem ser administrados por via intravenosa com riscos de necrose tecidual, anafilaxia e tromboflebite (ex. doxorubicina, vincristina, vinblastina), podem ser administrados por via oral em indivíduos mutantes, sendo mais conveniente o tratamento para proprietários e veterinários e aumentando a qualidade de vida dos animais (Mealey, 2008).

Deste modo, o diagnóstico molecular pode trazer benefícios a qualidade de vida do animal que varia desde a implantação de um protocolo terapêutico seguro até o prognóstico ao tratamento de diversos tipos de câncer.

## **6. CONCLUSÃO**

A mutação MDR1 nt230(del4) influencia na atividade da glicoproteína P que, conseqüentemente, altera concentração e resposta terapêutica de drogas de diversas classes e predispõe os indivíduos a determinadas doenças.

Mais estudos na farmacogenética do gene MDR1 devem ser realizados focando o seu impacto na farmacologia, eficácia de tratamentos, toxicidade e efeitos adversos dos substratos da P-gp, influenciando clinicamente o uso dessas drogas. Há necessidade também que novos estudos possam auxiliar na otimização da dosagem de drogas, monitoração clínica e na influência da preferência terapêutica, reduzindo intoxicações desnecessárias e complicações na prática clínica.

No Brasil, estudos com a P-gp ainda são escassos de modo que mais pesquisas devem ser desenvolvidas para sabermos da real importância do diagnóstico em nosso país. Entretanto, há expectativa de que tenhamos resultados semelhantes aos obtidos em outros países da América e Europa por se tratar de uma mutação antiga que ocorreu antes das linhagens de raças se segregarem.

## 7. ANEXOS

<i>Quimioterápicos</i>	<i>Glicosídeos Cardíacos</i>
doxorubicina	digoxina
mitoxantrone	diltiazem
paclitaxel	quinidina
vinblastina	verapamil
vincristina	losartan
actinomicina D	talinolol
docetaxel	
etoposide	<i>Esteróides</i>
	aldosterona
<i>Antimicrobianos / Antifúngicos</i>	cortisol
doxiciclina	dexametasona
eritromicina	estradiol
itraconazol	hidrocortisona
cetaconazol	metilprednisolona
rifampicina	
tetraciclina	<i>Diversos</i>
levofloxacina	butorfanol
	morfina
<i>Agentes Imunossupressores</i>	moxidectina
ciclosporina A	ivermectina
tacrolimus	fentanil
	fenotiazínicos
<i>Anti histamínicos</i>	selamectina
cimetidina	milbemicina oxima
ranitidina	loperamide
terfenadine	ondasetrona
	domperidone

Tabela 1. Substratos da P-gp utilizados na medicina veterinária (Martinez et al., 2008)

Tabela 2. Variação da presença do alelo mutante de acordo com as raças e a localização geográfica do estudo.

RAÇA COM MUTAÇÃO	MDR1 %	Reino Unido <sup>1</sup>	Alemanha <sup>2</sup>	Austrália <sup>3</sup>	França <sup>4</sup>	Bélgica <sup>5</sup>	EUA <sup>6</sup>	Japão <sup>7</sup>
COLLIE	(-/-)	31,2	36	24	48	28,5	35	41,7
	(+/-)	46,8	45	64	32	57	42	33,3
	(+/+)	22	19	12	20	14,5	23	25
PASTOR DE SHETLAND	(-/-)	1,1	8	0	-	0	1	0
	(+/-)	14,7	43	0,4	-	75	11	2,4
	(+/+)	84,2	49	99,6	-	25	88	97,6
PASTOR AUSTRALIANO	(-/-)	1,7	6	21	-	0	10	11,2
	(+/-)	29,8	32	43	-	60	37	44,4
	(+/+)	68,5	62	36	-	40	53	44,4
BORDER COLLIE	(-/-)	-	0,4	-	-	0	1	-
	(+/-)	-	0,9	-	-	0	1	-
	(+/+)	-	98,7	-	-	100	98	-
OLD ENGLISH SHEEPDOG	(-/-)	0	0	-	-	-	0	-
	(+/-)	14,3	8	-	-	-	2,5	-
	(+/+)	85,7	92	-	-	-	97,5	-
PASTOR AUSTRALIANO MINI	(-/-)	3,6	3	-	-	-	-	-
	(+/-)	44,6	43	-	-	-	-	-
	(+/+)	51,8	54	-	-	-	-	-
WHIPPET	(-/-)	15,7	15	-	-	-	0	-
	(+/-)	51,7	60	-	-	-	58	-
	(+/+)	32,6	25	-	-	-	42	-
MC NAB	(-/-)	2,8	-	-	-	-	-	-
	(+/-)	28,6	-	-	-	-	-	-
	(+/+)	68,6	-	-	-	-	-	-
SILKEN WINDHOUND	(-/-)	1,2	-	-	-	-	0	-
	(+/-)	33,3	-	-	-	-	31	-
	(+/+)	65,5	-	-	-	-	69	-
PASTOR ALEMÃO	(-/-)	-	-	-	-	0	2	-
	(+/-)	-	-	-	-	0	8	-
	(+/+)	-	-	-	-	100	90	-
WÄLLER	(-/-)	-	0	-	-	-	-	-
	(+/-)	-	35	-	-	-	-	-
	(+/+)	-	65	-	-	-	-	-
PASTOR SUIÇO	(-/-)	-	2	-	-	0	-	-
	(+/-)	-	23	-	-	20	-	-
	(+/+)	-	75	-	-	80	-	-
SRD	(-/-)	-	0	-	-	-	3	-
	(+/-)	-	3	-	-	-	8	-
	(+/+)	-	97	-	-	-	89	-

<sup>1</sup>Neff et al. (2004)

<sup>2</sup>Gramer et al. (2010)

<sup>3</sup>Mealey et al. (2005)

<sup>4</sup>Hugnet et al. (2004)

<sup>5</sup>Erkens et al. (2009)

<sup>6</sup>Mealey et al. (2008)

<sup>7</sup>Kawabata et al. (2005)

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBERTS, B.; BRAY, D.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. **Fundamentos da Biologia Celular (uma introdução a biologia molecular da célula)**. 1.ed. São Paulo: ARTMED, 2002. p.757.

APPLIED BIOSYSTEMS. A Guide to high resolution melting (HRM) analysis. **Applied Biosystems**. Disponível em: <<http://www.appliedbiosystems.com>>. Acesso em: 10 jun. 2011.

BAARS, C.; LEEB, T.; VON KLOPMANN, T.; TIPOLD, A.; POTSCSKA, H. Allele-specific polymerase chain reaction diagnostic test for the functional MDR1 polymorphism in dogs. **The Veterinary Journal**, v.177, p.394-397, 2008.

BARBET, J.L., SNOOK, T., GAY, J.M., MEALEY, K.L. ABCB1-1▲ (MDR1-1▲) genotype is associated with adverse reactions in dogs treated with milbemycin oxime for generalized demodicosis. **Veterinary Dermatology**, v.20, n.2, p.111-114, 2009.

CABELLO, G.M.K. Genética médica. **Ghente**. Métodos diagnósticos. Disponível online: <<http://www.ghente.org/ciencia/genetica/index.htm>> Acesso em: 20 jun. 2011.

CHAUDHARY, P.M.; RONINSON, I.B. Expression and activity of P-glycoprotein, a multidrug efflux pump, in human hematopoietic stem cells. **Cell**, v.66, p.85-94, 1991.

COLLNOT, E.M.; BALDES, C.; WEMPE, M.F.; KAPPL, R.; HÜTTERMANN, J.; HYATT, J.A.; EDGAR, K.J.; SCHAEFER, U.F.; LEHR, C.M. Mechanism of inhibition of P-glycoprotein mediated efflux by vitamin E TPGS: influence on ATPase activity and membrane fluidity. **Molecular Pharmaceutics**, v.4, p.465-474, 2007.

DOWLING, P. Pharmacogenetics: It's not just about ivermectin in collies. **Clinical Pharmacology Update**, v.47, p.1165-1168, 2006.

ERKENS, T.; DAMINET, S.; ROGIERS, C.; GOMMEREN, K.; LAMPO, E.; VANDER DONCKT, D.; VAN DEN BROEKE, A.; VAN POUCKE, M.; VAN ZEVEREN, A.; PEELMAN, L.J. Presence of the *ABCB1* (*MDR1*) deletion mutation causing ivermectin hypersensitivity in certain dog breeds in Belgium. **Vlaams Diergeneeskundig Tijdschrift**, v.78, p.256-260, 2009.

FELLNER, S.; BAUER, B.; MILLER, D.S.; SCHAFFRIK, M.; FANKHANEL, M.; SPRUSS, T.; BERNHARDT, G.; GRAEFF, C.; FARBER, L.; GSCHAIIDMEIER, H.; BUSCHAUER, A.; FRICKER, G. Transport of paclitaxel (Taxol) across the blood-brain barrier in vitro and in vivo. **Journal of Clinical Investigation**, v.110, p.1309-1318, 2002.

GEYER, J.; DÖRING, B.; GODOY, J.R.; LEIDOLF, R.; MORITZ, A.; PETZINGER, E. Frequency of the nt230 (del4) MDR1 mutation in Collies and related dog breeds in Germany. **Journal of Veterinary Pharmacology Therapy**, v.28, p.545-551, 2005.

GEYER, J.; KLINTZSCH, S.; MEERKAMP, K.; WÖHLKE, A.; DISTL, O.; MORITZ, A.; PETZINGER, E. Detection of the nt230(del4) MDR1 mutation in White Swiss Shepherd dogs: case reports of doramectin toxicosis, breed predisposition, and microsatellite analysis. **Journal of Veterinary Pharmacology Therapy**, v.30, p.482-485, 2007.

GONZALEZ-BOSQUET, J.; CALCEI, J.; WEI, J.S.; GARCIA-CLOSAS, M.; SHERMAN, M.E.; HEWITT, S.; VOCKLEY, J.; LISSOWSKA, J.; YANG, H.P.; KHAN, J.; CHANOCK, S. Detection of somatic mutations by high-resolution DNA melting (HRM) analysis in multiple cancers. *PLoS One*, v.6, n.1, e14522, 2001.

GRAMER, I.; LEIDOLF, R.; DÖRING, B.; KLINTZSCH, S.; KRÄMER, E.-M.; YALCIN, E.; PETZINGER, E.; GEYER, J. Breed distribution of the nt230(del4) *MDR1* mutation in dogs. **The Veterinary Journal**, v.189, p.67-71, 2011.

GUY, E.C.; JOYNSON, D.H.M. Potential of the polymerase chain reaction in the diagnosis of active *Toxoplasma* infection by detection of parasite in blood. **Journal Infectious Diseases**, v.172, p.319-322, 1995.

HAN, J.-I.; SON, H.-W.; PARK, S.-C.; NA, K.-J. Novel insertion mutation of ABCB1 gene in an ivermectin-sensitive Border Collie. **Journal of Veterinary Science**, v.11, n.4, p.341-314, 2010.

HENNESSY, M.; SPIERS, J.P. A primer on the mechanics of P-gp the multidrug transporter. **Pharmacological Research**, v.55, p.1-15, 2007.

HOFFMEYER, S.; BURK, O.; VON RICHTER, O.; ARNOLD, H.P.; BROCKMOLLER, J.; JOHNE, A.; CASCORBI, I.; GERLOFF, T.; ROOTS, I.; EICHELBAUM, M.; BRINKMANN, U. Functional polymorphisms of the human multidrug-resistance gene: Multiple sequence variations and correlation of one allele with P-glycoprotein expression and activity in vivo. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.97, p.3473-3478, 2000.

HUGNET, C.; BENTJEN, S.A.; MEALEY, K.L. Frequency of the mutant MDR1 allele associated with multidrug sensitivity in a sample of collies from France. **Journal of Veterinary Pharmacology Therapy**, v.27, p.227-229, 2004.

JULIANO, R.L.; LING, V. A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.455, p.152-162, 1976.

KAWABATA, A.; MOMOI, Y.; INOUE-MURAYAMA, M.; IWASAKI, T. Canine *mdr1* gene mutation in Japan. **Journal of Veterinary Medical Sciences**, v.67, p.1103-1107, 2005.

KISO, S.; CAI, S.H.; KITAICHI, K.; FURUI, N.; TAKAGI, K.; NABESHIMA, T.; HASEGAWA, T. Inhibitory effect of erythromycin on P-glycoprotein-mediated biliary excretion of doxorubicin in rats. **Anticancer Research**, v.20, p.2827-2834, 2000.

KLINTZSCH, S.; MEERKAMP, K.; DÖRING, B.; GEYER, J. Detection of the nt230[del4] MDR1 mutation in dogs by a fluorogenic 50 nuclease TaqMan allelic discrimination method. **The Veterinary Journal**, v.185, p.272-277, 2010.

MARTINEZ, M.; MODRIC, S.; SHARKEY, M.; TROUTMAN, L.; WALKER, L.; MEALEY, K. The pharmacogenomics of P-glycoprotein and its role in veterinary medicine. **Journal of Veterinary Pharmacology Therapy**, v.31, p.285-300, 2008.

MEALEY, K.L. Therapeutic implications of the MDR-1 gene. **Journal of Veterinary Pharmacology Therapy**, v.27, p.257-264, 2004.

MEALEY, K.L.; BENTJEN, S.A.; GAY, J.M.; CANTOR, G.H. Ivermectin sensitivity in collies is associated with a deletion mutation of the *mdr1* gene. **Pharmacogenetics**, v.11, p.727-733, 2001.

MEALEY, K.L.; BENTJEN, S.A.; WAITING, D.K. Frequency of the mutant MDR1 allele associated with ivermectin sensitivity in a sample population of Collies from the northwestern United States. **American Journal of Veterinary Research**, v.63, p.479-481, 2002.

MEALEY, K.L.; MEURS, K.M. Breed distribution of the ABCB1-1Δ (multidrug sensitivity) polymorphism among dogs undergoing ABCB1 genotyping. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v.233, n.6, p.921-924, 2008.

MEALEY, K.L.; MUNYARD, K.A.; BENTJEN, S.A. Frequency of the mutant MDR1 allele associated with multidrug sensitivity in a sample of herding breed dogs living in Australia. **Veterinary Parasitology**, v.131, p.193-196, 2005.

NEFF, M.W.; ROBERTSON, K.R.; WONG, A.K.; SAFRA, N.; BROMAN, K.W.; SLATKIN, M.; MEALEY, K.L.; PEDERSEN, N.C. Breed distribution and history of canine *mdr1-1* ▲, a pharmacogenetic mutation that marks the emergence of breeds from the collie lineage. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.101, n.32, p.11725-11730, 2004.

OGIHARA, T.; KAMIYA, M.; OZAWA, M.; FUJITA, T.; YAMAMOTO, A.; YAMASHITA, S.; OHNISHI, S.; ISOMURA, Y. What kinds of substrates show P-gp-dependent intestinal absorption? Comparison of verapamil and vinblastine. **Drug Metabolism and Pharmacokinetics**, v.21, p.238-244, 2006.

PANWALA, C.M.; JONES, J.C.; VINEY, J.L. A novel model of inflammatory bowel disease: mice deficient for the multiple drug resistance gene, *mdr1a*, spontaneously develop colitis. **Journal of Immunology**, v.161, p.5733-5744, 1998.

PULLIAM, J.D.; SEWARD, R.L.; HENRY, R.T.; STEINBERG, S.A. Investigating ivermectin toxicity in Collies. **Veterinary Medicine**, v.80, p.36-40, 1985.

ROULET, A.; PUEL, O.; GESTA, S.; LEPAGE, J.-F.; DRAG, M.; SOLL, M.; ALVINERIE, M.; PINEAU, T. MDR1-deficient genotype in Collie dogs hypersensitive to the P-glycoprotein substrate ivermectin. **European Journal of Pharmacology**, v.460, p.85-91, 2003.

SCHINKEL, A.H.; SMIT, J.J.; VAN TELLINGEN, O.; BEIJNEN, J.H.; WAGENAAR, E.; VAN DEEMTER, L.; MOL, C.A.; VAN DER VALK, M.A.; ROBANUS-MAANDAG, E.C.; TE RIELE, H.P. Disruption of the mouse *mdr1a* P-glycoprotein gene leads to a deficiency in the blood-brain barrier and to 3 increased sensitivity to drugs. **Cell**, v.77, p.491-502, 1994.

SCHINKEL, A.H.; WAGENAAR, E.; VAN DEEMTER, L.; MOL, C.A.A.M.; BORST, P. Absence of the *mdr1a* P-glycoprotein in mice affects tissue distribution and pharmacokinetics of dexamethasone, digoxin, and cyclosporin A. **Journal of Clinical Investigation**, v.96, p.1698-1705, 1995.

SCHWARZ, U.I.; GRAMATTE, T.; KRAPPWEIS, J.; BERNDT, A.; OERTEL, R.; VON RICHTER, O.; KIRCH, W. Unexpected effect of verapamil on oral bioavailability of the beta-blocker talinolol in humans. **Clinical Pharmacology and therapeutics**, v.65, p.283-290, 1999.

SEWARD, R.L. Reactions in dogs given ivermectin. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.183, p.493, 1983.

UEDA, K.; CARDARELLI, C.; GOTTESMAN, M.M.; PASTAN, I. Expression of a full-length cDNA for the human 'MDR1' gene confers resistance to colchicine, doxorubicin, and vinblastine. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.84, p.3004-3008, 1987.

WANDEL, C.; KIM, R.; WOOD, M.; WOOD, A. Interaction of morphine, fentanyl, sufentanil, alfentanil, and loperamide with the efflux drug transporter P-glycoprotein. **Anesthesiology**, v.96, n.4, p.913-920, 2002.

YAMAGUCHI, H.; YANO, I.; SAITO, H.; INUI, K. Pharmacokinetic role of P-glycoprotein in oral bioavailability and intestinal secretion of grepafloxacin in vivo. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v.300, n.3, p.1063-1069, 2002.

ZHOU, S.-F. Structure, function and regulation of P-glycoprotein and its clinical relevance in drug disposition. **Xenobiotica**, v.38, n.7-8, p.802-832, 2008.