

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA**

**FREQUÊNCIA GENOTÍPICA E ALÉLICA DA MUTAÇÃO nt230(del4) NO GENE
MDR1 EM CÃES DA RAÇA PASTOR ALEMÃO**

Ananda da Rocha Pires

Porto Alegre

2014/2

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA**

**FREQUÊNCIA GENOTÍPICA E ALÉLICA DA MUTAÇÃO nt230(del4) NO GENE
MDR1 EM CÃES DA RAÇA PASTOR ALEMÃO**

Autora: Ananda da Rocha Pires

**Monografia apresentada à Faculdade de
Veterinária como requisito parcial para a
obtenção da graduação em Medicina
Veterinária.**

**Orientador: Daniel Guimarães Gerardi
Coorientadora: Priscila Beatriz da Silva
Serpa**

PORTO ALEGRE

2014/2

AGRADECIMENTOS

Começar os agradecimentos nunca é fácil. Medo de esquecer aquele ou aquela que foi importante de alguma maneira para que tudo acontecesse. Mas aos poucos vem a inspiração e a lembrança de cada momento deste projeto.

Como não iniciar com aqueles que permitiram que esse projeto acontecesse? Os cães. Yucca, Roma, Tonto, Gisele, Quitta, Yvi, Gabi, Aley, Dhamya, Trix, Hanna, Zambia, Reza, Delfina, Nasa, Martina, Gioconda, Griffon, Morfeu, Tina, Can, Fred, Ozzy, Athos, Brutus, Tom, Else, Bruck, Finny, Ottis, Otto, Osma, Hermes, Ben 10, Zara, Naia, Zulu, Slloty, Brown, Baltho, Frida, Cacau, Raj, Endy, Bogus, Baidek, Atama, Lady, Max, Luma, Fred, Tigre, Jack, Argos, Xirú, Abby, Hulk, Átila, Dixi, Gajo, Apache, Thor, Frida, Xano, Iela, Sindi, Índia, Lara, Dely, Jana, Vida, Zam, Eny, Quita, Jeff, Perla, Polly, Duda, Bebe, Duque muito obrigada pela paciência, participação, interatividade e doçura. A todos os tutores e/ou responsáveis pelos animais o meu muito obrigada pela atenção, receptividade e parceria.

À minha família, Mãe, Pai e Mana, que independente do lado que vem a tormenta, ou mesmo que ela não venha, estão sempre presentes. Sem a base sólida e estruturada que vocês me proporcionam, a minha graduação em Medicina Veterinária na UFRGS nunca teria saído do desejo. Amo vocês incondicionalmente

Ao meu orientador, Daniel Gerardi, muito obrigada pela paciência e por me estimular a buscar sempre o meu melhor, por estar me apoiando em todos os momentos de dificuldade durante o planejamento e execução do projeto.

À minha coorientadora, amiga, parceira e “chefinha”, Priscila Serpa, por todos os anos de ensinamento durante a minha graduação e estágio dentro do laboratório. Sem ti, esse projeto nunca teria existido.

Ao meu colega, parceiro e namorado, Tainor, por toda ajuda física e emocional sempre, mas principalmente, a que fez esse projeto ir para frente. Tu foi essencial para a execução do projeto. Te amo.

Àquele que foi meu orientador e um grande amigo durante toda a faculdade, Cláudio Natalini, muito obrigada por ter me mostrado o melhor caminho para ser uma verdadeira Médica Veterinária.

Às Professoras Iraci e Rosane e às secretárias Tânia e Ieda do Departamento de Farmacologia da UFRGS, muito obrigada por toda força, disponibilidade e abertura de portas que vocês me deram.

RESUMO

A glicoproteína P é uma proteína transmembrana que funciona como uma bomba de efluxo para diversas substâncias no organismo. É codificada pelo gene MDR1 (*Multi Drug Resistance*) e pode apresentar uma mutação conhecida como nt230(del4). Esse polimorfismo é uma deleção de quatro pares de bases resultando na formação de uma proteína com menos de 10% da sua sequência original de aminoácidos, o que gera uma proteína afuncional. Várias raças de cães foram descritas como portadoras da mutação, principalmente, cães da raça Collie. Esta mutação foi encontrada também em cães da raça Pastor Alemão, entretanto há poucos estudos nesta raça. O presente estudo objetivou determinar a frequência genotípica e alélica da mutação nt230(del4) em cães da raça pastor alemão. Foram coletadas amostras sanguíneas de 80 cães pastores alemães residentes no Estado do Rio Grande do Sul. Os cães possuíam diferentes origens sendo provenientes não somente de outros estados do Brasil, mas também de outros países. Dos 80 cães, 78 (97,5%) apresentaram genótipo homozigoto dominante (selvagem), 1 (1,25%) apresentou genótipo heterozigoto e 1 (1,25%) genótipo homozigoto recessivo. O alelo mutante apresentou uma frequência baixa (1,88%) enquanto o selvagem apresentou uma frequência alta (98,1%). Dentro das cidades do Estado do Rio Grande do Sul onde foram coletados os animais (Porto Alegre, Canoas, Viamão, Gravataí, Novo Hamburgo, Torres e Dom Pedro de Alcântara), os cães da raça Pastor Alemão carregam o alelo da mutação nt230(del4) no gene MDR1.

Palavras-chave: ABCB1, canino, pastor alemão, glicoproteína P.

ABSTRACT

The P-glycoprotein is a transmembrane protein which acts as an efflux pump for many substances in the body. It is encoded by the MDR1 (Multi Drug Resistance) gene and may have a mutation known as nt230 (del4). This polymorphism is a deletion of four base pairs, resulting in the formation of a protein with less than 10% of its original amino acid sequence, which results in a nonfunctional protein. Several breeds were described as carriers of the mutation, mainly Collie breed dogs. This mutation was also found in German shepherd dogs, but there are few studies in this breed. This study aimed to determine the genotypic and allelic frequency of mutation nt230 (del4) in German Shepherd dogs. Blood samples were collected from 80 German Shepherds dogs living in the state of Rio Grande do Sul. The dogs were originated from different states of Brazil but also from other countries. In the dogs studied, 78 (97.5%) were dominant homozygous genotype (wild); 1 (1.25%) had heterozygous genotype and 1 (1.25%) recessive homozygous genotype. The mutant allele had a low frequency (1.88%) while the wild showed high frequency (98.1%). Within the cities of Rio Grande do Sul State where the animals were collected (Porto Alegre, Canoas, Viamão, Gravataí, Novo Hamburgo, Torres and Dom Pedro de Alcantara), the German Shepherd dogs carry the allele mutation nt230(del4) on the MDR1 gene.

Key Words: ABCB1, canine, German Shepherd, Glycoprotein – P.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Frequências (%) genotípicas para o gene MDR1 de 80 cães da raça Pastor Alemão.....	11
--	----

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	7
2	MATERIAIS E MÉTODOS.....	9
2.1	Seleção dos animais.....	9
2.2	Coleta de amostras.....	9
2.3	Análise das amostras.....	9
3	RESULTADOS.....	11
4	DISCUSSÃO.....	12
5	CONCLUSÃO.....	14
	REFERÊNCIAS.....	15

1 INTRODUÇÃO

Em 1983, Preston relatou um caso de intoxicação pelo uso de ivermectina em um cão da raça Collie. Em 2001, Mealey *et al.* descreveram uma mutação com deleção de quatro pares de bases no quarto éxon do gene MDR1. O gene MDR1 está localizado no cromossomo 14 da espécie *Canis familiaris* e é composto de 28 éxons. Codifica uma proteína transmembrana chamada de Glicoproteína P (gp-P) que funciona como uma bomba de efluxo de diversas substâncias sem estrutura relacionada e muitos xenobióticos, incluindo quimioterápicos, imunossupressores, agentes antiparasitários, agentes antimicrobianos, fármacos com função no sistema cardiovascular, opioides, hormônios esteroides e muitas outras (GRAMER *et al.*, 2011; GEYER; JANKO, 2012; MEALEY, 2013).

Esta mutação causa a formação de um “stop” códon prematuro, resultando em uma glicoproteína-P composta por menos de 10% de sua sequência original de aminoácidos, e, portanto, afuncional (MEALEY, *et al.*, 2001; FETCH, *et al.*, 2007). Este polimorfismo causa alteração na farmacocinética e farmacodinâmica dos substratos da gp-P, sendo assim, podem provocar efeitos adversos importantes, como por exemplo, intoxicação por lactonas macrocíclicas, como a ivermectina, levando ao aparecimento de sinais neurológicos e até à morte (FETCH *et al.*, 2007).

A gp-P está presente em diferentes tecidos, tais como barreira hematoencefálica, testículos, placenta, fígado, rins e intestinos, limitando a absorção de fármacos e promovendo a excreção na bile e urina (GRAMER *et al.*, 2011).

Os animais podem apresentar três diferentes genótipos para o gene MDR1, sendo: homozigoto dominante ou selvagem (S/S) o animal que não apresenta a mutação, heterozigoto (S/mut) é o animal portador do alelo mutante e homozigoto recessivo (mut/mut) o animal que apresenta a mutação.

Estudos demonstraram a presença desta mutação em diversas raças de cães, nos quais os Collies e suas linhagens, geralmente são os mais afetados (NEFF *et al.*, 2004; GEYER *et al.*, 2005; MEALEY, 2005; GEYER *et al.*, 2007; MEALEY; MEURS, 2008; GRAMER *et al.*, 2011, TAPPIN *et al.*, 2012, MEALEY, 2013). Entretanto, outras linhagens de cães apresentaram relatos de casos de intoxicação com fármacos substratos da gp-P. Mealey e Meurs relataram pela primeira vez em 2008 a presença da mutação em cães da raça Pastor Alemão.

Há uma diversidade de informações a respeito da frequência do alelo mutante em Pastores Alemães, variando de 0% (GRAMER *et al.*, 2011) a 6% (MEALEY; MEURS,

2008). Gramer *et al.* (2011) sugerem que a variação de informações sobre a frequência do alelo mutante em cães Pastores Alemães ocorre porque muitos estudos agrupam cães da raça Pastor Alemão e cães da raça Pastor Branco Suíço como uma única raça. Por isso, existe a necessidade de estudos sobre a real frequência do alelo mutante em cães da raça Pastor Alemão.

Desta forma, este trabalho objetivou determinar se o alelo mutante está presente em cães Pastores Alemães residentes em cidades do Estado do Rio Grande do Sul, e qual a frequência dos três genótipos (homozigoto selvagem, heterozigoto ou homozigoto mutante) e do alelo mutante para este gene sendo esses animais desde cães de companhia e exposição, até cães de guerra e guarda da Polícia do Exército, Brigada Militar e Aeronáutica.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Seleção dos animais

A escolha dos animais foi realizada de forma direcionada, priorizando animais de canis de criação e exposição, de canis da Polícia do Exército, Brigada Militar e Aeronáutica residentes no Estado do Rio Grande do Sul. Entretanto, tutores de cães Pastores Alemães que se interessassem em participar da pesquisa, foram incluídos no projeto. Um animal mestiço de Pastor Alemão foi incluído no estudo, pois chegou ao Hospital de Clínicas Veterinárias da UFRGS apresentando sintomatologia nervosa após ter recebido uma dose de ivermectina e, também, por possuir semelhança física com a raça.

As cidades foram escolhidas de acordo com a localização dos canis. Foram coletadas amostras em batalhões da Polícia do Exército, Brigada Militar e Aeronáutica, e canis criadores da raça localizados nas cidades de Porto Alegre, Canoas, Viamão, Gravataí, Novo Hamburgo, Torres e Dom Pedro de Alcântara. Entretanto, apesar dos animais serem residentes no Estado, grande parte dos animais tem origem em diferentes Estados do Brasil como Santa Catarina, São Paulo e Rio de Janeiro e outros são provenientes de outros países como Alemanha, Argentina, Itália, França e Hong Kong.

2.2 Coleta de amostras

Foram coletadas amostras sanguíneas com volume de 3mL em tubos à vácuo com anticoagulante EDTA da veia cefálica de 80 cães da raça Pastor Alemão. Para a coleta foi realizada a antisepsia do local a ser puncionado.

Os animais foram contidos somente por meio de mordaca ou focinheira e um auxiliar manteve o membro anterior estendido para a realização da coleta. Todas as coletas foram realizadas no local de residência dos animais.

2.3 Análise das amostras

Para análise do material coletado, primeiramente, foi extraído o DNA de cada amostra de sangue total por meio do Kit Comercial - *NucleoSpin® Blood Genomic DNA from blood and biological fluids* da empresa alemã Macherey-Nagel.

Após, para a amplificação do DNA foi realizada a Reação em Cadeia da Polimerase segundo Fetch *et al.* (2007). A fim de obter um volume total de 25µL, foram adicionados 4µL de DNA (~200ng), tampão 1x (20mM Tris-HCl pH 8,4, 50mM KCl), 1,5mM MgCl₂, 2,5% DMSO, 0,4mM dNTP, 0,5µM de cada primer (forward 5' - GGC TTG ATA GGT TGT ATA

TGT TGG TG- 3' e reverse 5'- ATT ATA ACT GGA AAA GTT TTG TTT- 3') e 1U de Taq DNA Polimerase.

A reação alcançada por meio de um termociclador ocorre com um ciclo de desnaturação inicial de 94°C por 4 minutos, seguido de 32 ciclos de desnaturação a 94°C por 30 segundos, anelamento a 55°C por 1 minuto e extensão a 72°C por 30 segundos.

Para observação dos genótipos dos animais, realizou-se a eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante 6%. Para isso, as amostras foram desnaturadas à 95°C por 5 minutos para a possível migração no gel desnaturante. Posteriormente, foi realizada a visualização por meio da revelação com nitrato de prata segundo Sanguinetti, Neto e Simpson (1994).

3 RESULTADOS

Dos 80 cães analisados originários das cidades de Porto Alegre, Canoas, Viamão, Gravataí, Novo Hamburgo, Torres e Dom Pedro de Alcântara, 78 (97,5%) apresentaram genótipo selvagem – S/S (homozigoto dominante), ou seja, não apresentaram o alelo mutante; 1 animal (1,25%) apresentou genótipo heterozigoto – S/mut (o animal é portador do alelo mutante), e 1 animal (1,25%) apresentou genótipo homozigoto recessivo – mut/mut (o animal possui a mutação nos dois alelos para o gene MDR1). As frequências genotípicas estão representadas na tabela 1.

Tabela 1- Frequências (%) genotípicas para o gene MDR1 de 80 cães da raça Pastor Alemão.

Raça	Total	Genótipo S/S	Genótipo S/mut	Genótipo mut/mut
Pastor Alemão	100	97,5	1,25	1,25

Fonte: o próprio autor.

Dentro da população de cães analisada, a frequência do alelo mutante encontrada foi de 1,87%, sendo que apenas um animal apresentou os dois alelos mutantes (homozigoto recessivo) para o gene MDR1 e um animal apresentou um alelo mutante (heterozigoto) para o mesmo gene. A frequência do alelo selvagem foi de 98,1%.

4 DISCUSSÃO

A mutação nt230(del4) foi identificada pela primeira vez em cães da raça Pastor Alemão por Mealey e Meurs (2008). Nesse estudo, foram genotipados 166 pastores alemães sendo 149 homozigotos dominantes (90%), 14 heterozigotos (8%) e 3 homozigotos recessivos (2%). Até aquele momento, não se sabia que cães da raça Pastor Alemão carregavam a mutação. O presente estudo verificou se há realmente a presença do alelo mutante na população de cães Pastores Alemães, visto que o estudo apresentado em 2008 por Mealey e Meurs sugere a presença da mutação na raça, mas os cães que a apresentaram não eram Pastores Alemães e, sim, Pastores Brancos Suíços.

O fato de cães Pastores Alemães apresentarem a mutação nt230(del4) é interessante visto que estudos mostram que ela deriva de apenas 1 cão de trabalho que vivera na Grã-Bretanha em meados de 1800 e é idêntica para os seus descendentes. Acredita-se que esse tenha sido o reprodutor que deu origem à raça Collie e em menor escala à raça Old English Sheepdog (NEFF *et al.*, 2004; FETCH *et al.*, 2007), no entanto, cães da raça Pastor Alemão não dividem a ancestralidade com essas raças (NEFF *et al.*, 2004, MEALEY; MEURS, 2008).

No estudo de Mealey e Meurs (2008), dos três cães que apresentaram a mutação, dois eram Pastores Brancos Suíços e o outro possuía pais ou avós que eram dessa mesma raça. Acredita-se que Pastores Brancos Suíços são descendentes dos Pastores Alemães (GEYER, *et al.*, 2007). Diferentemente da Europa, nos Estados Unidos os Pastores Brancos Suíços não são conhecidos como raça e frequentemente são referidos como Pastores Alemães (GRAMER *et al.*, 2011). Isso nos remete a uma dúvida: será que Pastores Alemães sem relação com o fator branco carregam o alelo mutante?

Geyer *et al.* (2007) relataram os primeiros dois casos da presença do alelo mutante em dois Pastores Brancos Suíços e, após genotiparem 217 outros cães dessa mesma raça, detectaram uma frequência de 2% de animais homozigotos recessivos. Também realizaram um análise de microssatélites a fim de identificar os haplótipos da mutação nessa raça e comparar com os determinados por Neff *et al.* (2004) para as raças da linhagem dos Collies. O resultado foi que todos os Pastores Brancos Suíços que carregavam o alelo mutante, possuíam um haplótipo que divide três dos quatro marcadores alélicos demonstrados por Neff *et al.* (2004) para a linhagem dos Collies. Isso significa que os Pastores Brancos Suíços possuem a mutação idêntica aos cães que derivam da raça Collie. Entretanto, esse haplótipo é mais comumente encontrado e mais relacionado com o encontrado em cães da linhagem dos

Sighthounds (Whippets de pelo longo, por exemplo), por isso, os Pastores Brancos Suíços podem ter adquirido a mutação da linhagem dos Sighthounds e não dos Collies.

Poucos estudos genotiparam cães da raça Pastor Alemão para o gene MDR1 a fim de determinar a presença e/ou a frequência da mutação nessa raça (MEALEY; MEURS, 2008; ERKENS, *et al.*, 2009; BARBET, *et al.*, 2009; GRAMER, *et al.*, 2011; TAPPIN, *et al.*, 2012; ASAWAKARN, *et al.*, 2013). Dentre eles, somente Mealey e Meurs (2008) encontraram o alelo mutante na raça.

Foi encontrado o alelo mutante em dois dos 80 cães analisados neste estudo. Isso representa uma frequência baixa, tanto do alelo mutante, quanto dos genótipos homozigoto recessivo e heterozigoto. O resultado condiz parcialmente com os outros estudos citados anteriormente que avaliaram a presença da mutação nessa raça, onde todos os animais apresentavam genótipo selvagem. Todavia, nesse estudo, foi demonstrada a presença do alelo mutante na raça Pastor Alemão o que vai ao encontro do que Mealey e Meurs (2008) mostraram em seu estudo.

Dos dois animais que apresentaram o alelo mutante, o animal com genótipo heterozigoto é proveniente de um canil, apresentando registro oficial no Kennel Club do Rio Grande do Sul (KCRGS) e o padrão racial desejado para a raça Pastor Alemão. O animal com genótipo homozigoto recessivo foi atendido no Hospital de Clínicas Veterinárias da UFRGS com histórico de intoxicação por ivermectina e é um cão mestiço de Pastor Alemão. Isso nos mostra que cães da raça Pastor Alemão possuem o alelo mutante em sua linhagem e, pelos Pastores Brancos Suíços derivarem dessa raça (GEYER, *et al.*, 2007), podem ter herdado a mutação deles.

Estudos mais detalhados sobre a origem da mutação na raça Pastor Alemão são necessários para poder afirmar que esta trata-se da mesma origem da mutação presente em cães da raça Collie, como foi realizado por Geyer, *et al.* (2007) com os Pastores Brancos Suíços.

5 CONCLUSÃO

Com base nos resultados deste estudo, dentro das cidades do Estado do Rio Grande do Sul onde foram coletados os animais (Porto Alegre, Canoas, Viamão, Gravataí, Novo Hamburgo, Torres e Dom Pedro de Alcântara), os cães da raça Pastor Alemão carregam o alelo da mutação nt230(del4) no gene MDR1.

A frequência do alelo mutante foi baixa, enquanto a frequência do alelo selvagem mostrou-se alta.

REFERÊNCIAS

- ASAWAKARN, S., *et al.* Determination of multidrug resistance (MDR1) gene and its mutations in dogs by using polymerase chain reaction. **Thai Journal of Veterinary Medicine**. Bangkok, v. 42, n. 1, p. 37–42, Mar. 2012.
- BARBET, J. L., *et al.* ABCB1-1 Delta (MDR1-1 Delta) genotype is associated with adverse reactions in dogs treated with milbemycin oxime for generalized demodicosis. **Veterinary Dermatology**, Oxford, v. 20, n. 2, p. 111–114, Apr. 2009.
- ERKENS, T. *et al.* Presence of the ABCB1 (MDR1) deletion mutation causing ivermectin hypersensitivity in certain dog breeds in Belgium. **Vlaams Diergeneeskundig Tijdschrift**, Lewven, v. 78, n.4, p. 256–260, 2009.
- FECHT, S. *et al.* Analysis of the canine *mdr1-1Delta* mutation in the dog breed Elo. **Journal of Veterinary Medicine**, Berlin, v. 54, n. 8, p. 401–405, Oct. 2007.
- GEYER, J. *et al.* Frequency of the nt230 (del4) MDR1 mutation in Collies and related dog breeds in Germany. **Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics**, Oxford, v. 28, n. 6, p. 545–551, Dec. 2005.
- GEYER, J. *et al.* 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 and Therapeutics**, Oxford, v. 30, n. 5, p. 482–485, Oct. 2007.
- GEYER, J.; JANKO, C. Treatment of MDR1 mutant dogs with macrocyclic lactones. **Current Pharmaceutical Biotechnology**, Hilversum, v. 13, n. 6, p. 969–986, May 2012.
- GRAMER, I. *et al.* Breed distribution of the nt230(del4) MDR1 mutation in dogs. **The Veterinary Journal**, London, v. 189, n. 1, p. 67–71, July 2011.
- MEALEY, K. L. Adverse drug reactions in veterinary patients associated with drug transporters. **The Veterinary Clinics of North America Small Animal Practice**, Philadelphia, v. 43, n. 5, p. 1067–1078, Sep. 2013.
- MEALEY, K. L., *et al.* Ivermectin sensitivity in collies is associated with a deletion mutation of the *mdr1* gene. **Pharmacogenetics**, London, v. 11, n. 8, p. 727–733, Nov. 2001.
- 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**, Amsterdam, v. 131, n. 3-4, p. 193–196, Aug. 2005.
- NEFF, M. W., *et al.* Breed distribution and history of canine *mdr1-1Δ*, 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**, Washington, DC, v. 101, n. 32, p. 11725–11730, Aug. 2004.

SANGUINETTI, C.J.; DIAS, E.N.; SIMPSON, A. J. G. Rapid silver staining and recovery of PCR products separated on polyacrylamide gels. **Biotechniques**, London, v. 17, n. 5, p. 914–921, Nov. 1994.

TAPPIN, S. W., *et al.* Frequency of the mutant MDR1 allele in dogs in the UK. **The Veterinary record**, London, v. 171, n. 3, p. 72, July, 2012.