

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

A glicoproteína P e o gene MDR1

Autor: Daniele Pankowski Bezerra

**PORTO ALEGRE
2011/2**

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

A glicoproteína P e o gene MDR1

Autor: Daniele Pankowski Bezerra

**Trabalho apresentado como requisito
parcial para graduação em Medicina
Veterinária**

Orientador: Cláudio Corrêa Natalini

PORTO ALEGRE

2011/2

RESUMO

O gene de resistência a múltiplas drogas, o MDR1, e a glicoproteína-P (Gp-P) são um assunto recente em medicina veterinária e merecem destaque pela importância do tema. O MDR1 codifica a Gp-P, uma glicoproteína transportadora transmembrana que protege o organismo contra xenobióticos. A Gp-P está relacionada com a resistência a drogas e com alguns casos de intoxicações em animais susceptíveis, como por exemplo, os cães da raça Collie e afins. Diversos fármacos já foram descritos como substratos e/ou inibidores da Gp-P, porém a modulação de sua atividade ainda não está elucidada. A farmacogenética estuda o comportamento de drogas no organismo de acordo com as características genéticas do indivíduo e, a genotipagem o gene MDR1 representa a incorporação desta área da farmacologia na clínica veterinária, customizando a terapêutica para atender as necessidades de cada paciente.

Palavras chave: MDR1, Glicoproteína-P, Gp-P, farmacogenética, cães, lactonas macrocíclicas.

ABSTRACT

The multiple drug resistance gene, MDR1, and P-glycoprotein (P-gp) are a recent and important topic in veterinary medicine. MDR1 gene encodes P-gp, a transmembrane transporter glycoprotein that protects the organism against xenobiotics. P-gp is related to multiple drugs resistance and some intoxications in susceptible dogs, such as Collie like breeds. A variety of drugs have been described as P-gp substrates and/or inhibitors, although their modulation is not well established. The pharmacogenetics studies drug behavior within individual genetic characteristics and genotyping MDR1 gene represents the use of pharmacogenetics in veterinary clinic, customizing the therapy for each patient.

Key words: *MDR1, P-glycoprotein, P-gp, pharmacogenetics, dogs, macrocyclic lactones.*

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E UNIDADES

ABC: *ATP-binding cassette*

ABCB1: gene de resistência a múltiplas drogas

ATP: trifosfato de adenosina

Da: dalton

DNA: ácido desoxirribonucleico

EDTA: ácido etilenodiamino tetra- acético

Gp-P: glicoproteína P

kDa: kilodaltons

MDR1: gene de resistência a múltiplas drogas

MDR1 +/+: homocigoto normal (ou selvagem) para o gene MDR1

MDR1 +/-: heterocigoto para o gene MDR1

MDR1 -/-: homocigoto mutante para o gene MDR1

PCR: reação em cadeia de polimerase

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	6
2	A MEMBRANA PLASMÁTICA	7
2.1	Transportadores de membrana.....	7
2.2	Família ABC.....	8
3	GLICOPROTEÍNA P (GP-P)	9
3.1	Drogas substratos e inibidores da gp-p.....	11
3.2	Modulação da gp-p	15
4	RESISTÊNCIA A MÚLTIPLAS DROGAS	18
5	MEDICINA VETERINÁRIA.....	19
5.1	Cães mutantes para o mdrl	19
5.1.1	Cães mutantes para o mdrl e as lactonas macrocíclicas	26
5.1.2	Teste de diagnóstico do gene mdrl em cães.....	27
6	CONCLUSÕES.....	28
	REFERÊNCIAS.....	29

1 INTRODUÇÃO

O tema desta monografia, “A glicoproteína P e o gene MDR1”, foi escolhido por se tratar de um assunto relativamente recente e de grande importância na Medicina Veterinária. O gene MDR1 e sua expressão, a glicoproteína P (Gp-P) estão envolvidos na absorção, distribuição, metabolização e excreção de diversos fármacos no organismo (AMBUDKAR *et al.*, 2003; LINARDI; NATALINI, 2006).

O gene de resistência a múltiplas drogas, MDR1 (*multidrug resistance*), também descrito como ABCB1 (porque pertence à família ABC de transportadores), codifica a Gp-P (MEALEY, 2004). A Gp-P funciona como uma bomba de efluxo contra xenobióticos, protegendo o organismo da ação de determinados fármacos. A função da glicoproteína é impedir a entrada de fármacos na célula ou promover a eliminação dos mesmos, dependendo da sua localização. Animais que não possuem este mecanismo de proteção, como os que apresentam a mutação no gene MDR1, demonstram sinais de intoxicação ao receberem drogas que sejam substratos para a Gp-P. Estes sinais incluem: depressão, ataxia, sonolência, midríase, salivação, tremores (GEYER *et al.*, 2005; FECHT *et al.*, 2007), desorientação, coma e morte (FECHT *et al.*, 2007).

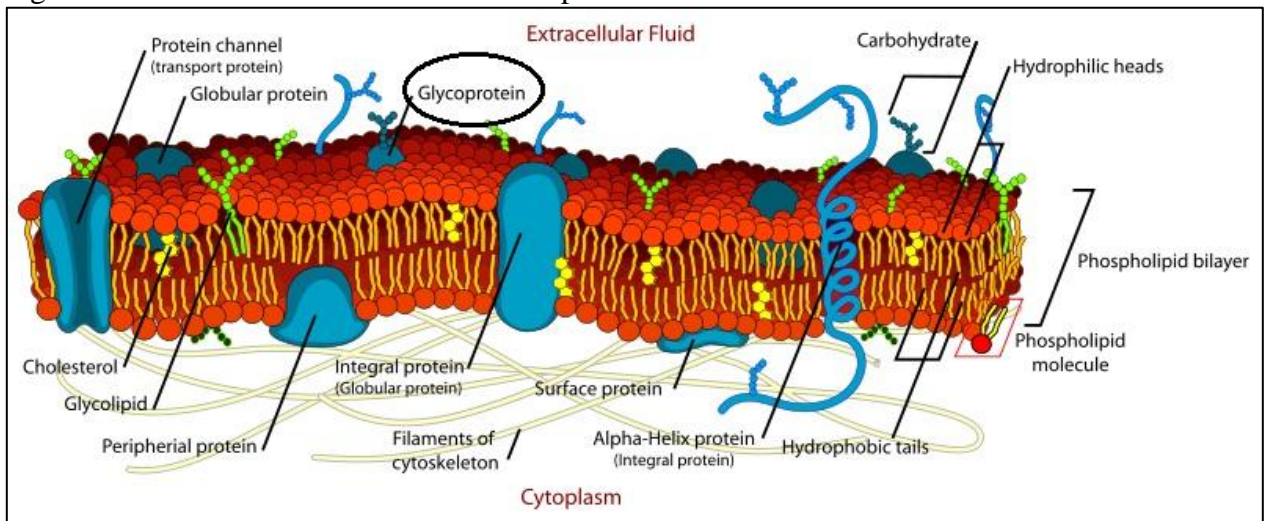
Hoje, através de técnicas de biologia molecular é possível determinar o *status* genético do animal em relação ao gene MDR1 e avaliar se ele é ou não susceptível aos efeitos tóxicos de diversas drogas. Este avanço representa o primeiro passo para a incorporação da Farmacogenética na clínica veterinária (MEALEY, 2004).

2 A MEMBRANA PLASMÁTICA

As membranas celulares possuem uma camada lipídica dupla, que serve como barreira para a maioria das moléculas polares (ALBERTS *et al.*, 2010). São duas camadas de fosfolípidios com os grupamentos apolares (hidrofóbicos) voltados para dentro e os grupamentos polares (hidrofílicos) voltados para fora (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 1999) (Figura 1).

Inseridas na membrana, estão moléculas proteicas que mantêm a constância do meio intracelular, em equilíbrio com o meio extracelular (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 1999). Dentre estas proteínas presentes na membrana plasmática estão as transportadoras transmembrana, que estão na estrutura da membrana celular, envolvendo as porções extra, trans e intracelular (Figura 1). A glicoproteína P (Gp-P) é uma proteína transportadora, de alto peso molecular apresentando uma conformação espacial tal que atravessa a membrana diversas vezes.

Figura 1 – Membrana Plasmática com transportadores transmembrana.



Fonte: <http://php.med.unsw.edu.au/cellbiology/images/a/aa/Cell_membrane.png>. Acesso em: 16 nov. 2011.

2.1 Transportadores de membrana

As proteínas de transporte de membranas são responsáveis pela passagem de diversas moléculas polares através da membrana plasmática, entre eles, íons, açúcares, aminoácidos, nucleotídeos e metabólitos celulares (ALBERTS *et al.*, 2010). Para que o transporte ocorra, a proteína requer energia e a partir daí sofre mudanças conformacionais que possibilitam a chegada

da molécula do outro lado da membrana. Existe uma especificidade, demonstrada na década de 50, entre as moléculas e as proteínas que as transportam (ALBERTS *et al.*, 2010).

Um grande número de genes codificam para proteínas transportadoras, e algumas doenças humanas hereditárias ocorrem devido a mutações que afetam o transporte celular, o que reforça a importância do assunto (ALBERTS *et al.*, 2010).

Diversos transportadores de membrana que fazem o efluxo de drogas para fora da célula já foram descritos, porém a Gp-P é uma das mais bem caracterizadas até o momento (AMBUDKAR *et al.*, 2003; FROMM, 2004).

2.2 Família ABC

A família *ATP-binding cassette* (ABC) representa uma das maiores e mais importantes famílias de proteínas transportadoras (SCOTTO, 2003; FROMM, 2004; AMBUDKAR *et al.*, 2006; ALBERTS *et al.*, 2010). Ela é chamada de *ATP-binding cassette* porque possui dois sítios de ligação de ATP onde os transportadores se ligam e/ou hidrolisam moléculas de ATP, obtendo, desta forma, a energia necessária para bombear compostos específicos para fora da célula (DEAN, 2009), mesmo contra o gradiente de concentração (SHUGARTS & BENET, 2009). Centenas de substratos como hormônios, lipídios, fármacos e outras toxinas são transportados através de membranas por transportadores ABC (SCOTTO, 2003).

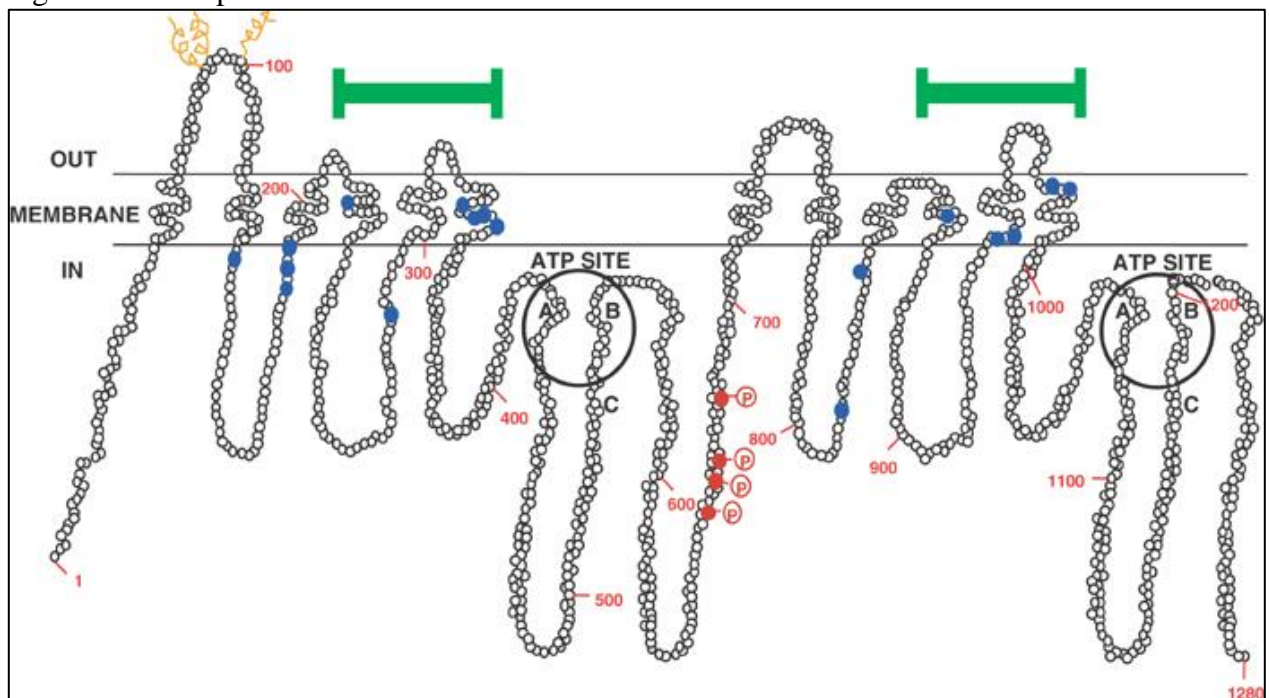
A Gp-P pertence a esta família, e por isto o gene MDR1 também é conhecido como gene ABCB1 (GOTTESMAN *et al.*, 2002; AMBUDKAR *et al.*, 2003; FROMM, 2004; MEALEY, 2004; LINARDI; NATALINI, 2006; BISSONNETTE *et al.*, 2008; FLETCHER *et al.*, 2010; GRAMER *et al.*, 2011; THE INTERNATIONAL TRANSPORTER CONSORTIUM, 2011).

3 GLICOPROTEÍNA P (Gp-P)

A Gp-p foi descrita pela primeira vez por Juliano e Ling em 1976 em células ovarianas de hamster Chinês (MEALEY, 2004). Desde então, muitos pesquisadores têm estudado a Gp-P para entender melhor a sua interação com diversos substratos e encontrar uma forma de modular a sua atividade.

A Gp-P é uma proteína transportadora transmembrana que possui um grupamento açúcar, ou seja, é uma glicoproteína. Ela é uma molécula grande, pesando 170 kDa, e possui 12 regiões transmembrana e dois sítios de ligação de ATP (Figura 2) (GOTTESMAN *et al.*, 2002).

Figura 2 – Glicoproteína-P.



Fonte: <http://www.nature.com/onc/journal/v22/n47/fig_tab/1206948f3.html>. Acesso em: 15 nov. 2011.

Quando um substrato liga em determinada região (cada substrato é específico para uma região da molécula) da Gp-P há o estímulo da atividade da ATPase, o que causa uma mudança conformacional que resulta na liberação do substrato para o outro lado da membrana.

A Gp-P transporta diversos substratos lipofílicos e anfipáticos de carga neutra ou positiva (WILKINSON, 2001; GOTTESMAN *et al.*, 2002; SCOTTO, 2003), incluindo drogas, toxinas e

xenobióticos, muitos deles usados em produtos veterinários (SCHRICKX; FINK-GREMMELS, 2008).

Ela já foi descrita em diversas espécies: camundongos, roedores, cães, bovinos, equinos, macacos e seres humanos (LINARDI; NATALINI, 2006). E está presente em diversos tecidos:

- a) Intestino Delgado (GOTTESMAN *et al.*, 2002; AMBUDKAR *et al.*, 2003; FROMM, 2004; MEALEY, 2004; GEYER *et al.*, 2005; LINARDI; NATALINI, 2006).
- b) Fígado (GOTTESMAN *et al.*, 2002; AMBUDKAR *et al.*, 2003; FROMM, 2004; MEALEY, 2004; GEYER *et al.*, 2005; LINARDI; NATALINI, 2006).
- c) Rins (GOTTESMAN *et al.*, 2002; AMBUDKAR *et al.*, 2003; FROMM, 2004; MEALEY, 2004; GEYER *et al.*, 2005; LINARDI; NATALINI, 2006).
- d) Barreira Hematoencefálica (GOTTESMAN *et al.*, 2002; AMBUDKAR *et al.*, 2003; FROMM, 2004; MEALEY, 2004; GEYER *et al.*, 2005; LINARDI; NATALINI, 2006).
- e) Testis (AMBUDKAR *et al.*, 2003; FROMM, 2004; MEALEY, 2004; GEYER *et al.*, 2005).
- f) Ovários (AMBUDKAR *et al.*, 2003).
- g) Barreira Hemoplacentária (GOTTESMAN *et al.*, 2002; FROMM, 2004; MEALEY, 2004; GEYER *et al.*, 2005; LINARDI; NATALINI, 2006).
- h) Medula Espinhal (LINARDI; NATALINI, 2006).

A função da Gp-P em tecidos normais é diminuir a absorção entérica e a penetração através das barreiras hematoencefálica, placentária e testis, e aumentar a excreção biliar e urinária de certos fármacos (GEYER *et al.*, 2005). Possui um papel importante na barreira hematoencefálica, onde, localizada nas células do endotélio capilar (MEALEY, 2004), evita a penetração de substâncias citotóxicas (GOTTESMAN *et al.*, 2002).

3.1 Drogas substratos e inibidores da Gp-P

Fármacos de diversas classes químicas são substratos (Tabela 1) para a Gp-P (AMBUDKAR *et al.*, 2006). Uma característica que parece ser comum aos substratos da Gp-P é eles serem hidrofóbicos e terem massa molecular entre 300 e 2000 Da (AMBUDKAR *et al.*, 2003). Vários deles possuem anéis aromáticos (GODA, 2009). A Gp-P não transporta compostos aniônicos (AMBUDKAR *et al.*, 2003), somente cátions e compostos neutros (GOTTESMAN *et al.*, 2002).

Tabela 1 – Substratos descritos da Gp-P e sua classe.

Substrato	Classe
Actinomicina D ^{a,b,c,d,g,h,j,o}	Antineoplásico
Adriamicina ^e	Antineoplásico
Aldosterona ^{a,g,j}	Esteróide
Amitriptilina ^{f,g,j}	Antidepressivo
Amprenavir ^{f,h}	Antiviral
Atorvastatina ^f	Agente redutor do colesterol
Berberina ^p	Outros
Bisantrene ^{c,d,o}	Antineoplásico
Bunitronol ^{f,h}	Antagonista β-adrenérgico
<i>Calcein acetoxymethyl ester</i> ^a	Agente citotóxico
<i>Camptothecins</i> ^o	Agente citotóxico
Carvedilol ^{f,h}	Antagonista β-adrenérgico
Celiprolol ^{f,h}	Antagonista β-adrenérgico
Cetoconazol ^{g,j,l}	Antimicrobiano
Cimetidina ^h	Anti-histamínico (H ₂)
Colchicina ^{a,b,d,e,f,m,n,o}	Agente citotóxico
Cortisol ^{g,j}	Esteróide
Ciclosporina A ^{f,l}	Imunossupressor
Ciclosporina ^{g,j}	Imunossupressor
Dactinomicina ^{b,d}	Antineoplásico

(continua na próxima página)

Tabela 1 (continuação)

Substrato	Classe
Daunorubicina ^{a,b,c,d,h,o}	Antineoplásico
Debrisoquina ^f	Antidepressivo
Dexametasona ^{a,f,g,j}	Esteróide
Digotoxina ^{f,h}	Digitálico
Digoxina ^{d,f,g,h,j,m,n,p}	Digitálico
Diltiazem ^{f,g,h,j}	Bloqueador de canais de Ca ²⁺
Docetaxel ^{a,c,d,f,g,h,j,o}	Antineoplásico
Domperidona ^{g,j}	Butirofenona
Doxorubicina ^{a,b,c,d,e,g,h,j,m,o,p}	Antineoplásico
Doxiciclina ^{g,j}	Antimicrobiano
Emetine ^{a,b}	Agente citotóxico
Eritromicina ^{f,g,h,j}	Antimicrobiano
Etoposide ^{a,b,c,d,f,g,h,j,m,o}	Antineoplásico
Fenitoína ^f	Bloqueador de canais de Na ⁺
Fenotiazinas ^{g,j}	Tranquilizante
Fexofenadine ^{f,h,n,p}	Anti-histamínico anti H ₁
Gleevec (STI-571) ^d	Outros
Gramicidin D ^b	Agente citotóxico
Gramicidina D ^a	Agente citotóxico
Hoechst 33342 ^a	Outros
Homoharringtonine c(STI-571),d	Outros
Imatinib ^{f,h,o}	Antineoplásico
Indinavir ^{f,h,n}	Antiviral
Irinotecan ^p	Outros
Itraconazol ^{f,g,j}	Antimicrobiano
Ivermectina ^{g,i,j}	Lactona Macroclícica
Leupeptin ^a	Peptídeo cíclico e linear
Levofloxacin ^{f,g,h,j}	Antimicrobiano

(continua na próxima página)

Tabela 1 (continuação)

Substrato	Classe
Loperamida ^{g,i,j,p}	Opióide
Losartan ^f	Simpatolítico
Lovastatina ^f	Agente redutor do colesterol
<i>Methotrexane</i> ^o	Antineoplásico
Metilprednisolona ^{f,g,j}	Esteróide
Mibefradil ^{f,h}	Bloqueador de canais de Ca ²⁺
<i>Mitomycin</i> ^{b,d}	Agente citotóxico
Mitoxantrone ^{a,g,j,o}	Antineoplásico
Morfina ^{f,g,j}	Opióide
Moxidectina ^{j,l}	Lactona Macroclíca
NAc-Leu-Leu-Met-al ^a	Peptídeo cíclico e linear
NAc-Leu-Leu-norLeu-al ^a	Peptídeo cíclico e linear
Nelfinavir ^{f,h}	Antiviral
Nonactina ^a	Peptídeo cíclico e linear
Ondansetron ^{g,h,j}	Antiemético
Paclitaxel ^{a,b,c,d,e,f,h,m,n,o,p}	Antineoplásico
Pepstatina A ^a	Peptídeo cíclico e linear
<i>Prenyl-Cys methyl esters</i> ^a	Outros
Puromicina ^{a,b,d}	Agente citotóxico
Quinidina ^{f,i}	Bloqueador de canais de Na ⁺
Ranitidina ^h	Anti-histamínico (H ₂)
Reserpina ^h	Antagonista β-adrenérgico
Rodamina 123 ^a	Outros
Rifampicina ^{f,h}	Antimicrobiano
Ritonavir ^{f,h}	Antiviral
Saquinavir ^{f,h,m,o}	Antiviral
Selamectina ^{i,j}	Lactona Macroclíca
Sirolimus ^f	Imunossupressor

(continua na próxima página)

Tabela 1 (continuação)

Substrato	Classe
Sparfloxacina ^{g,j}	Antimicrobiano
Tacrolimus ^{f,g,j}	Imunossupressor
Talinolol ^{f,g,h,j}	Antagonista β -adrenérgico
Taxol ^d	Agente citotóxico
Teniposide ^{a,b,c,d,f,h,o}	Antineoplásico
Terfenadina ^{f,g,h,j}	Anti-histamínico anti H ₁
Tetraciclina ^{g,h,j}	Antimicrobiano
Topotecan ^{b,n}	Agente citotóxico
Triton X-100 ^a	Outros
Valinomycin ^b	Agente citotóxico
Vecurônio ^{g,j}	Bloqueador neuromuscular
Verapamil ^{f,g,j}	Bloqueador de canais de Ca ²⁺
Vinblastina ^{a,b,c,d,e,f,g,h,j,m,o,p}	Antineoplásico
Vincristina ^{a,b,c,d,e,f,g,h,j,n,o}	Antineoplásico
VP16 ^e	Outros
<i>Yeast a-factor</i> ^a	Peptídeo cíclico e linear
^{99m} Tc-SESTAMIBI ^a	Rádioisótopo

Nota:^a Sharom, (1997).^b Sauna *et al.* (2001).^c Gottesman *et al.* (2002).^d Ambudkar *et al.* (2003).^e Scotto, (2003).^f Fromm, (2004).^g Mealey, (2004).^h Linardi; Natalini, (2006).ⁱ Mealey, (2006).^j Martinez *et al.* (2008).^l Bissonnette *et al.* (2008).^m Dean, (2009).ⁿ Shugarts; Benet, (2009).^o Fletcher *et al.* (2010).^p THE INTERNATIONAL..., (2010).

3.2 Modulação da Gp-P

Através do conhecimento de drogas que são substratos (Tabela 1) e/ou inibidores (Tabela 2) da Gp-P é possível interferir na ação da glicoproteína e, conforme Lespine *et al.* (2008), aumentar a concentração de fármacos nos organismos e a eficiência do tratamento. Szakács *et al.* (2006) também comentam que moduladores de transportadores da família ABC, como a Gp-P, podem ser usados para influenciar a biodisponibilidade oral de fármacos e a penetração de drogas no sistema nervoso central.

Tabela 2 – Inibidores descritos da Gp-P e sua classe.

Inibidor	Classe
Acetato de megestrol ^b	Esteróide
Amiodarona ^{a,c,e,h}	Antiarrítmico
Azidopina ^{a,b}	Bloqueador de canais de Ca ²⁺
Biricodar (VX-710) ^c	Outros
Bromocriptina ^{e,h}	Outros
Carvedilol ^{e,h}	Antagonista β-adrenérgico
Cefalosporinas ^{b,d}	Antimicrobiano
Cetoconazol ^{e,f,g,h}	Antimicrobiano
Chloroquine ^a	Outros
Ciclosporina A ^{a,b,c,d,g}	Imunossupressor
Ciclosporina ^{e,f,h,j}	Imunossupressor
Clorpromazina ^{a,e,h}	Fenotiazínico
Cortisol ^a	Esteróide
<i>Cremophor EL</i> ^a	Detergentes e anfifílicos
Curcumina ^d	Fitoquímico
<i>Dexniguldipine</i> ^{a,c}	Bloqueador de canais de Ca ²⁺
Dexverapamil ^c	Bloqueador de canais de Ca ²⁺
Dihydropyridines ^{b,d}	Bloqueador de canais de Ca ²⁺
<i>Dipyridamole</i> ^a	Outros

(continua na próxima página)

Tabela 2 (continuação)

Inibidor	Classe
Disulfiram (Antabuse) ^{b,d}	Agente antiálcool
Eritromicina ^{e,h}	Antimicrobiano
Fenotiazínicos ^c	Tranquilizantes
FK 506 ^{a,b}	Imunossupressor
Fluoxetina ^{g,j}	Antidepressivo
GF-902128 (acridinecarboxamine derivative) ^c	Outros
GG918 ⁱ	Outros
<i>Grapefruit juice</i> ^{e,h}	Outros
Indinavir ^b	Antiviral
Ioimbina ^b	Antagonista α -adrenérgico
Itraconazol ^{e,h}	Antimicrobiano
Ivermectina ^h	Lactona macrocíclica
Metadona ^{e,h}	Opióide
Nicardipine ^{e,h}	Cardiac drugs
Nifedipine ^a	Bloqueador de canais de Ca^{2+}
Paroxetina ^{e,h}	Antidepressivo
Pentazocine ^{e,j}	Opióide
Progesterone ^{a,b,c,d}	Esteróide
Quinacrine ^c	Outros
Quinidina ^{a,b,c,e,f,h,j}	Bloqueador de canais de Na^{+}
Quinina ^{b,c,d}	Bloqueador de canais de Na^{+}
Reserpina ^{a,b,d}	Antagonista β -adrenérgico
Retanavir ^b	Antiviral
Saquinavir ^{b,d}	Antiviral
Several neuroleptics ^c	Outros
Solutol HS15 ^a	Detergentes e anfifílicos
<i>St. John's wort</i> ^{e,h}	Antidepressivo
Tacrolimus ^{e,h}	Imunossupressor

(continua na próxima página)

Tabela 2 (continuação)

Inibidor	Classe
Tamoxifeno ^{a,c,e,g,h}	Antineoplásico
Tariquidar ^j	Outros
Terfenadine ^a	Antagonista do receptor H ₁
<i>Trans</i> -flupenthixol ^a	Antagonista da calmodulina
Trifluoperazine ^a	Antagonista da calmodulina
<i>Tween 80</i> ^a	Detergentes e anfifílicos
<i>Valinomycin</i> ^a	Peptídeo cíclico
Valspodar (PSC-833) ^{a,c,f}	Outros
Verapamil ^{a,b,c,d,e,f,h,i,j}	Bloqueador de canais de Ca ²⁺

Nota:^a SHAROM (1997).^b SAUNA *et al.* (2001).^c GOTTESMAN *et al.* (2002).^d AMBUDKAR *et al.* (2003).^e MEALEY (2004).^f LINARDI; NATALINI (2006).^g MEALEY (2006).^h MARTINEZ *et al.* (2008).ⁱ SHUGARTS; BENET (2009).^j THE INTERNATIONAL..., (2010).

Algumas complicações associadas à inibição da Gp-P pode ser porque o inibidor utilizado possa inibir também outras vias envolvidas na metabolização de fármacos, como o citocromo P450, o que gera reações adversas (SZAKÁCS *et al.*, 2006). A modulação da Gp-P é viável (SZAKÁCS *et al.*, 2006), porém mais estudos são necessários para desenvolver drogas que cumpram esta função sem causar maiores prejuízos ao indivíduo.

4 RESISTÊNCIA A MÚLTIPLAS DROGAS

O fenômeno de resistência a múltiplas drogas é bem estudado em humanos, em pacientes oncológicos. O insucesso de diversas terapias anticâncer ocorre pelo aumento do efluxo de agentes quimioterápicos pela Gp-P, para fora da célula, o que leva à diminuição dos níveis intracelulares das drogas e, conseqüentemente, à falha na terapia (FLETCHER *et al.*, 2010). As células podem se tornar resistentes a drogas por diversos mecanismos, mas o mais importante é a super expressão da Gp-P que está associada a uma redução do acúmulo de fármacos no alvo terapêutico (SHAROM, 1997; AMBUDKAR *et al.*, 2003; SZAKÁCS *et al.*, 2006).

5 MEDICINA VETERINÁRIA

O estudo do gene MDR1 e Glicoproteína-P em Medicina Veterinária é recente. Animais que demonstram sinais de toxicidade a alguns fármacos com doses terapêuticas podem ter uma mutação no gene MDR1 e, na ausência da Gp-P, serem mais sensíveis a estas drogas.

A espécie mais estudada em veterinária sobre este tema é a canina, e a situação mais bem estabelecida é a da intoxicação por ivermectina em cães. Em geral são animais que possuem o alelo mutante MDR1 (-) do gene ABCB1 e, por esta razão, apresentam deficiência da Gp-P. Qualquer espécie pode apresentar a mutação, o que demonstra a importância de investigar melhor o tema em diversos animais.

5.1 Cães mutantes para o MDR1

Alguns cães apresentam uma mutação no gene MDR1, que os torna sensíveis a variados fármacos substrato da Gp-P. Segundo Fecht *et al.* (2007), o gene MDR1 está localizado, em *Canis familiaris*, no cromossomo 14 e é composto por 28 éxons. A mutação, também denominada MDR1 nt230(del4), *mdr1-1Δ*, ABCB1-1Δ (GRAMER *et al.*, 2011), consiste na deleção de quatro pares de bases (pb) no quarto éxon. O resultado desta deleção é o deslocamento da sequência de nucleotídeos, que resulta na síntese de glicoproteínas-P defeituosas, afuncionais, tornando o animal portador da mutação susceptível a intoxicações (FECHT *et al.*, 2007; BISSONNETTE *et al.*, 2008).

O animal pode ser homozigoto (MDR1 +/+) para o gene MDR1, neste caso ele é normal (ou selvagem) e não apresenta o mesmo risco que animais homozigotos mutantes. O homozigoto (MDR1 -/-) é o mutante, e apresenta extrema sensibilidade e predisposição a intoxicações. O heterozigoto (MDR1 +/-) é portador da mutação (possui apenas um alelo), podendo se intoxicar em maior ou menor grau (BISSONNETTE *et al.*, 2008). Cabe salientar que, por se tratar de um defeito genético, ele é transmissível para a prole e cuidados devem ser tomados para não acasalar animais que tenham a probabilidade de gerar filhotes mutantes.

A mutação já foi identificada em diversas raças, como *Collie* (Figura 3), *American Collie*, *Longhaired/Rough Collie*, *Smooth Collie*, *Longhaired Whippet* (Figura 4), *Shetland Sheepdog* (Figura 5), *Miniature Australian Shepherd*, *Australian Shepherd* (Figura 6), *Wäller* (Figura 7), *White Swiss Shepherd*, *Old English Sheepdog*, *Border Collie*, *Herding Breed mix* (cães com pai

ou mãe de raça de pastoreio, como *Collie* ou *Border Collie*, por exemplo), cães sem raça definida (GRAMER *et al.*, 2011), *English Shepherd*, *German Shepherd*, *McNab*, *Silken Windhound* (Figura 8) (WASHINGTON STATE UNIVERSITY, 2010). As imagens apresentadas são apenas exemplos de algumas raças, existem diversas variações de pelagens e cruzamentos, além de não estarem todas elas ilustradas.

Figura 3 – Cães da raça *Collie*



Fonte: <http://animalku.com/wp-content/uploads/2011/07/collie_dog6.jpg>. Acesso em: 21 nov. 2011.

Figura 4 – Cão da raça *Longhaired Whippet*



Fonte: <http://www.thepetdirectory.us/Longhaired_Whippet.htm>. Acesso em: 21 nov. 2011.

Figura 5 - Cães da raça *Shetland Sheepdog*



Fonte: <<http://www.dogsonline.com/gallery/breed/shetland-sheepdog/shetland-sheepdog/>>. Acesso em: 23 nov. 2011.

Figura 6 - Cão da raça *Australian Shepherd*



Fonte: <<http://dogbreedinformations.com/australian-shepherd/australian-shepherd-dog-breed-information/>>. Acesso em: 23 nov. 2011.

Figura 7 - Cães da raça *Wäller* (ou *Waeller*)



Fonte: <http://www.waeller-vom-albtrauf.de/Der_Waeller.html>. Acesso em: 23 nov. 2011.

Figura 8 - Cão da raça *Silken Windhound*



Fonte: <<http://www.silkenwindhound.com/>>. Acesso em: 23 nov. 2011.

A provável origem da mutação seria de um ancestral comum, um cão que viveu na Grã-Bretanha no século 18 (NEFF *et al.*, 2004). Antes de 1870 não haviam registros de raças, os cães *sheepdogs* (pastores, ovelheiros) eram próprios de cada região, adaptados ao trabalho e ao clima (NEFF *et al.*, 2004). Com o advento da industrialização, no século 19, os cães não eram mais indispensáveis para o trabalho e teve início a criação de raças registradas com seleção morfológica em detrimento da funcional e diversas linhagens desapareceram (NEFF *et al.*, 2004). *Collie*, *Old English Sheepdog* e *Shetland Sheepdog* foram as primeiras raças oficiais e descendem de cães pastores que habitavam a Grã-Bretanha por volta da metade do século 18 (NEFF *et al.*, 2004).

GRAMER *et al.* (2011) genotiparam 6544 cães para o gene MDR1, na Alemanha. Já a Universidade de Washington genotipou diversos caninos nos Estados Unidos. As raças testadas e a frequência de aparecimento do alelo MDR1 estão listadas na Tabela 3.

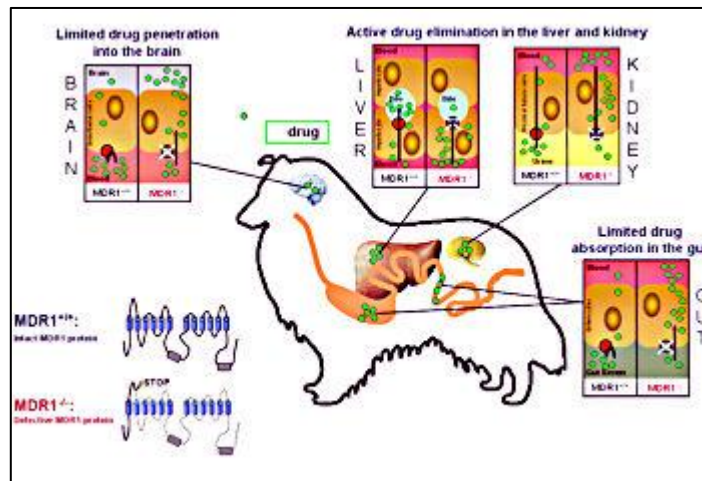
Tabela 3 – Raças e a frequência (%) do alelo mutante MDR1 (-)

Raça	Frequência do alelo MDR1 (-) em %	
	GRAMER <i>et al.</i> (2011)	Washington State University (2010)
	Alemanha	Estados Unidos
<i>Collie (Collie, American Collie, Longhaired/Rough Collie, Smooth Collie)</i>	59	70
<i>Longhaired Whippet</i>	45	65
<i>Shetland Sheepdog</i>	30	15
<i>Miniature Australian Shepherd</i>	24	50
<i>Australian Shepherd</i>	22	50
<i>English Shepherd</i>	-	15
<i>German Shepherd</i>	-	10
<i>Wäller</i>	17	-
<i>White Swiss Shepherd</i>	14	-
<i>Old English Sheepdog</i>	4	5
<i>McNab</i>	-	30
<i>Border Collie</i>	1	<5
<i>Silken Windhound</i>	-	30
<i>Herding Breed mix (cães com pai ou mãe de raça de pastoreio)</i>	8	10
<i>Mixed Breed</i>	2	5

Fonte: adaptada de Gramer *et al.* (2011) e Washington State University (2010).

Cães mutantes (MDR1 $-/-$) são susceptíveis a efeitos neuro, nefro e hepatotóxicos de certas drogas, uma vez que eles apresentam maior absorção entérica, maior penetração nas barreiras hematoencefálica, testis e placentária e, por outro lado, diminuição da excreção biliar e urinária (Figura 9) (GEYER *et al.*, 2005).

Figura 9 – Esquema demonstrando a penetração, eliminação e absorção de drogas através da Gp-P no cérebro, fígado, rins e intestino



Fonte: <http://www.vetmed.uni-giessen.de/pharmtox/ag_geyer/research.php>. Acesso em: 20 nov. 2011.

Os sinais clínicos compatíveis com neurotoxicidade incluem: depressão, ataxia, sonolência, midríase, salivação, tremores (GEYER *et al.*, 2005, FECHT *et al.*, 2007), desorientação, coma e morte (FECHT *et al.*, 2007). Porém, casos de neurotoxicidade não são exclusivos de animais mutantes e outras explicações devem ser consideradas nestes casos. Em um estudo realizado por Bissonnette *et al.* (2008), foram investigados 28 animais com sinais de neurotoxicidade induzida por lactonas macrocíclicas (classe de drogas do qual a ivermectina faz parte) e concluíram que 27 deles eram homocigotos normais (MDR1 $+/+$) para o gene. Uma possibilidade seria a metabolização enzimática do citocromo P450, que metaboliza diversos compostos, incluindo xenobióticos. Além disso, muitos substratos e inibidores da Gp-P são também do CYP3A4 (NIES, 2001).

5.1.1 Cães mutantes para o MDR1 e as lactonas macrocíclicas

A ivermectina é uma lactona macrocíclica bastante utilizada na Medicina Veterinária como endo e ectoparasiticida (GEYER *et al.*, 2005). O mecanismo de ação da ivermectina é a ativação de canais de cloro regulados por glutamato e pelo ácido γ -aminobutírico (GABA), aumentando a permeabilidade aos íons cloro e causando paralisia e morte do parasita (GEYER *et al.*, 2005; BISSONNETTE *et al.*, 2008). Em artrópodos estes canais estão localizados nas junções neuromusculares; em nematódeos, eles se localizam nos neurônios motores e interneurônios do corno nervoso ventral (BISSONNETTE *et al.*, 2008). Os vertebrados não possuem canais de cloro regulados por glutamato (BISSONNETTE *et al.*, 2008). Os canais GABA estão restritos ao sistema nervoso central, que é protegido pela barreira hematoencefálica, característica que confere ampla margem de segurança à ivermectina (NEFF *et al.*, 2004; BISSONNETTE *et al.*, 2008).

Na década de 90, pesquisadores na Holanda, ao tratar camundongos com ivermectina, a fim de combater ácaros, concluíram que a lactona macrocíclica é substrato para a Gp-P. Os camundongos tratados que eram *knockout* pro gene MDR1 (*mdr1a* *-/-*) morreram, enquanto os selvagens (normais) não foram afetados (VANDICKEN, 2006; SCHRICKX; FINK-GREMMELS, 2008). Esta descoberta veio de encontro a já sabida experiência clínica de que cães da raça Collie possuem alta sensibilidade à ivermectina (SCHRICKX; FINK-GREMMELS, 2008).

A ivermectina é indicada para prevenção da dirofilariose, também conhecida como verme do coração, causada pela *Dirofilaria immitis* na dose de 0,006 mg.kg⁻¹, por via oral, uma vez ao mês (MEALEY, 2006). No Canadá, a ivermectina só é aprovada para uso em cães com a finalidade de prevenir a dirofilariose, na dose de 0,006 - 0,012 mg.kg⁻¹ uma vez ao mês (BISSONNETTE *et al.*, 2008).

A maioria dos cães tolera até 2,5 mg/kg de ivermectina via oral, porém alguns cães sensíveis devem receber no máximo 0,1 mg/kg (MEALEY, 2006). Mesmo para animais sensíveis à ivermectina a dose terapêutica para controle da dirofilariose é considerada segura.

Na dermatologia canina, é utilizada a ivermectina para o tratamento de sarna. Apesar de não ser aprovada para este uso na espécie canina, a dose usual é de 0,3 a 0,6 mg.kg⁻¹ (BISSONNETTE *et al.*, 2008). Neste caso, animais portadores do alelo mutante podem apresentar sintomas de neurotoxicidade.

Cães que convivem com equinos e bovinos requerem uma atenção especial. Existe a possibilidade de intoxicação por lactonas macrocíclicas ao ingerir excremento de equinos ou bovinos que tenham recebido a referida droga (WILKINSON, 2001; VANDICKEN, 2006). Como a ivermectina é eliminada ativa nas fezes, é possível que cães demonstrem sinais clínicos de neurotoxicidade ao ingerir fezes destes animais após o tratamento com o endectocida.

5.1.2 Teste de diagnóstico do gene MDR1 em cães

Através de técnicas de biologia molecular, é possível determinar o *status* genético do animal em relação ao gene MDR1 e determinar a sua susceptibilidade a intoxicações. Em cães, este diagnóstico é rotineiramente realizado nos Estados Unidos, no Laboratório de Farmacologia Clínica Veterinária da Universidade do Estado de Washington (*Veterinary Clinical Pharmacology Lab da Washington State University* (Washington State University (2010))) e na Alemanha, na Universidade de Gießen (*Institut für Pharmakologie und Toxikologie* (Justus-Liebig-Universität Gießen (2011))). No Brasil, este serviço é oferecido pelo Laboratório de Farmacogenética Animal, do Departamento de Farmacologia do Instituto de Ciências Básicas da Saúde da UFRGS.

Para a realização do exame é necessário uma amostra de sangue com EDTA, que é centrifugada e o DNA é extraído da capa leucocitária e purificado, através de um *kit* comercial. O DNA é amplificado, por meio da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), e o amplicon é visualizado após a eletroforese em gel de poliacrilamida. É possível identificar o status genético do animal, ou seja, se ele é homozigoto normal (MDR1 +/+), mutante (MDR1 -/-) ou heterozigoto (MDR1 +/-). Com esta informação, o veterinário pode escolher a terapia mais apropriada para cada paciente.

O teste do gene MDR1 é fundamental antes de iniciar o tratamento do animal com algum fármaco já descrito como substrato da Gp-P (Tabela 1) (GEYER *et al.*, 2005). Em terapias com mais de uma droga, há a possibilidade de inibição da Gp-P, com conseqüente aumento na absorção e diminuição da excreção de algum fármaco, causando toxicidade para o animal. Além disto, algumas associações de raças condicionam o registro e a comercialização de cães ao teste.

6 CONCLUSÕES

A Farmacogenética é uma área nova da farmacologia que estuda o comportamento de drogas no organismo de acordo com as características genéticas do indivíduo. Pode ser a base para elucidar reações idiossincrásicas e adversas de fármacos que variam entre a população e promover eficiência e segurança terapêutica com um tratamento direcionado a um indivíduo ou população.

Genotipar o MDR1 pode representar o primeiro passo para a incorporação da Farmacogenética na clínica veterinária, customizando a terapêutica para atender as necessidades de cada paciente. Apesar de o assunto ser estudado há mais de 30 anos, as pesquisas devem ser contínuas, principalmente na Medicina Veterinária, que apresenta uma carência de publicações nesta área, pois a maioria dos artigos publicados se referem à Medicina Humana.

Diversos modelos celulares são usados para testar substratos de transportadores, porém, para prever a farmacocinética, estudos devem ser validados *in vivo*. Uma vez validadas *in vivo*, as pesquisas devem contemplar várias espécies animais.

REFERÊNCIAS

- ALBERTS, B. *et al.* Transporte de membrana de pequenas moléculas e as propriedades elétricas das membranas. **Biologia molecular da célula**. 5. ed. Porto Alegre: Artmed, 2010. cap. 11, p. 651-694.
- AMBUDKAR, S. V. *et al.* P-glycoprotein: from genomics to mechanism. **Oncogene**, v. 22, p. 7468-7485, 2003.
- AMBUDKAR, S. V.; KIM, I. W.; SAUNA, Z. E. The power of the pump: mechanisms of action of P-glycoprotein (ABCB1). **European journal of pharmaceutical sciences**, v. 27, p. 392–400, 2006.
- BISSONNETTE, S. *et al.* The *ABCB1-1Δ* mutation is not responsible for subchronic neurotoxicity seen in dogs of non-collie breeds following macrocyclic lactone treatment for generalized demodicosis. **Journal Compilation**. v. 20, p. 60-66, 2008.
- DEAN, M. ABC transporters, drug resistance, and cancer stem cells. **J Mammary Gland Biol Neoplasia**, v. 14, p. 3–9, 2009.
- FECHT, S. *et al.* Analysis of the Canine *mdr1-1Δ* Mutation in the Dog Breed Elo. **J. Vet. Med.**, n. 54 p. 401-405, 2007.
- FLETCHER, J. I., *et al.* ABC transporters in cancer: more than just drug efflux pumps. **NATURE REVIEWS Cancer**, v. 10 p. 147-156, feb. 2010.
- FROMM, M. F. Importance of P-glycoprotein at blood–tissue barriers. **TRENDS in Pharmacological Sciences**, v. 25 n. 8 p. 423-429, ago. 2004.
- GEYER *et al.* Development of a PCR-based diagnostic test detecting a nt230(del4) MDR1 mutation in dogs: verification in a moxidectin-sensitive Australian Shepherd. **J. vet. Pharmacol. Therap.**, n. 28, p. 95–99, 2005.
- GODA, K.; BACSÓ, Z.; SZABÓ, G. Multidrug Resistance Through the Spectacle of P-Glycoprotein. **Current Cancer Drug Targets**, n. 8, p. 281-297, 2009.
- GOTTESMAN, M. M.; FOJO, T.; BATES, S. E. Multidrug resistance in cancer: role of ATP-dependent transporters. **NATURE REVIEWS cancer**, v.2, p. 48-58, jan. 2002.
- GRAMER, I. *et al.* Breed distribution of the nt230(del4) MDR1 mutation in dogs. **The Veterinary Journal**, n. 189 . 67-71, 2011.
- JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. O citoplasma. **Histologia Básica**. 9. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999. cap. 2, p. 19-39.

- JUSTUS-Liebig-Universität Gießen. **MDR1 Diagnostik**. 2011. Disponível em: <http://www.vetmed.uni-giessen.de/pharmtox/mdr1_defekt/diagnostik.php>. Acesso em: 21 nov. 2011.
- LESPINE, A. *et al.* ABC transporter modulation: a strategy to enhance the activity of macrocyclic lactone anthelmintics. **Trends in Parasitology**, v. 24, n. 7. p.293-298, 2008.
- LINARDI, R. L.; NATALINI, C.C. Multi-drug resistance (MDR1) gene and P-glycoprotein influence on pharmacokinetic and pharmacodynamic of therapeutic drugs. **Ciência Rural**, v.36, n.1, p.336-341, Santa Maria, jan-fev, 2006.
- MARTINEZ, M. *et al.* The pharmacogenomics of P-glycoprotein and its role in veterinary medicine. **J. vet. Pharmacol. Therap.**, n. 31, p. 285-300, 2008.
- MEALEY, K. L. Therapeutic implications of de MDR-1 gene. **J. vet. Pharmacol. Therap.**, n. 27. p. 257-264, 2004.
- MEALEY, K. L. Ivermectin: Macrolide Antiparasitic Agents. In: PETERSON, M. E.; TALCOTT, P. A. **Small Animal Toxicology**. 2. ed. Missouri: Elsevier Saunders. cap. 51, p. 785-794, 2006.
- NEFF, M. W. *et al.* Breed distribution and history of canine mdr1-1, a pharmacogenetic mutation that marks the emergence of breeds from the collie lineage. **PNAS**, v. 101, n. 32, p. 11725–11730, aug. 2004.
- NIES, A. S. Principles of therapeutics. In: GOODMAN, L. S.; GILMAN, A. **The Pharmacological basis of therapeutics**. 10th ed. [s.l.]: McGraw-Hill, 2001. c. 3, p. 45-66.
- SAUNA, Z. E. *et al.* The Mechanism of Action of Multidrug-Resistance-Linked P-Glycoprotein. **Journal of Bioenergetics and Biomembranes**, v. 33, n. 6, p. 481-491, dec. 2001.
- SCHRICKX, J. A.; FINK-GREMMELS, J. Implications of ABC transporters on the disposition of typical veterinary products. **European Journal of Pharmacology**, n. 585, p. 510-519, 2008.
- SCOTTO, K. W. Transcriptional regulation of ABC drug transporters. **Oncogene**, n. 22, p. 7496-7511, 2003.
- SHAROM, F. J. The P-Glycoprotein Efflux Pump: How Does it Transport Drugs? **J. Membrane Biol.**, n.160 p.161–175, 1997.
- SHUGARTS, S.; BENET, L. Z. The role of transporters in the pharmacokinetics of orally administered drus. **Pharmaceutical Research**, v. 26, n. 9. P. 2039-2054, set. 2009.
- SZAKÁCS, G. *et al.* Targeting multidrug resistance in cancer. **NATURE REVIEWS DRUG DISCOVERY**, v. 5, p. 219-234, mar. 2006.

THE INTERNATIONAL TRANSPORTER CONSORTIUM. Membrane transporters in drug development. **NATURE REVIEWS DRUG DISCOVERY**, v. 9, p. 215-236, mar. 2010.

VANDICKEN, M. „MDR1-Defekt“ – was ist das? **Sheltie News**. p. 4-8, mar. 2006. Disponível em: <<http://www.mdr1-defekt.de/texte/Sheltienews.pdf>>. Acesso em: 13 nov. 2011.

WASHINGTON State University. **Affected Breeds**. 2010. Disponível em: <<http://www.vetmed.wsu.edu/depts-vcpl/breeds.aspx>>. Acesso em: 21 nov. 2011.

WASHINGTON State University. **Multidrug Sensitivity in Dogs**. 2011. Disponível em: <<http://www.vetmed.wsu.edu/depts-vcpl/>>. Acesso em: 21 nov. 2011.

WILKINSON, G. R. Pharmacokinetics. In: GOODMAN, L. S.; GILMAN, A. **The Pharmacological basis of therapeutics**. 10th ed. [s.l.]: McGraw-Hill, 2001. c. 1, p. 3-29.