

Mutação MDR1-nt230(del4) em cães da raça Collie

CLÁUDIA RODRIGUES DA SILVA¹

KARINE GEHLEN BAJA²

CLÁUDIO CORREA NATALINI³

KATIANA SANTOS STELMACH PEREIRA⁴

PAULO RICARDO LOSS AGUIAR⁵

RESUMO

O gene MDR1 é responsável pela expressão de uma proteína de membrana denominada de P-glicoproteína (P-gp). A expressão desta limita o acesso de drogas ao cérebro. Assim, a P-gp possui importante papel na barreira hematoencefálica. Algumas raças de animais são mais sensíveis a determinadas medicações, sendo a sensibilidade à ivermectina um exemplo clássico. Tal sensibilidade está correlacionada à mutação MDR1-nt230(del4). Este trabalho objetivou definir o genótipo de 14 cães da raça Collie, comparando os resultados encontrados e os referenciados na literatura sobre a incidência de sinais clínicos de intoxicação e de resistência a esta intoxicação em Collies.

Palavras-chave: MDR1, P-glicoproteína, Collie, ivermectina, PCR.

ABSTRACT

The MDR1 gene express a membrane protein, the P-glycoprotein (P-gp). This expression limits the access of the drugs to the brain. So, the P-gp has a very significant function about blood-brain barrier. Some races of animals are more sensible to determined drugs. The case of collies and intoxication with ivermectin is a classic

¹ Acadêmica do Curso de Medicina Veterinária/ULBRA – Aluno Voluntário PROICT/ULBRA

² Professor(a) do Curso de Medicina Veterinária/ULBRA

³ Professor do Curso de Medicina Veterinária e PPG/UFRGS

⁴ Acadêmica do Curso de Biomedicina/ULBRA

⁵ Professor-Orientador do Curso de Medicina Veterinária/ULBRA (praguiar@terra.com.br)

example. This sensibility is because the MDR1-nt230 (del4) mutation. This study objectify define 14 collie dogs's genotype, connecting it to incidence of clinical signs of intoxication and resistance to this intoxication on the collies.

Key words: MDR1, P-glycoprotein, Collie, ivermectin, PCR.

INTRODUÇÃO

A disposição de drogas (absorção, distribuição, metabolização e excreção) pode ser alterada por fatores relacionados às propriedades físico-químicas dos fármacos, como o peso molecular, lipofilicidade, solubilidade e grau de ionização ou por fatores biológicos, como o tempo de trânsito gastrointestinal, pH luminal, fluxo sanguíneo da mucosa e ligação protéica. A maioria destes fatores é capaz de alterar a absorção intestinal ou a habilidade dos fármacos em atravessar a barreira hematoencefálica e hemoplacentária (WANDEL et al., 2002). Porém, Miuzo et al. (2003) citam que além desses fatores capazes de influenciar a variabilidade interindividual relacionada à farmacocinética e farmacodinâmica de determinados fármacos, existe a participação de um gene nesses processos, o gene de resistência múltipla a drogas, MDR1.

O MDR1 (*Multi Drug Resistance 1*), também conhecido como ABCB1, é responsável pela expressão de uma proteína transportadora de membrana, da superfamília *ATB Binding Cassete* (ABC), denominadas P-glicoproteínas (P-gp).

As P-gps expressadas pelo gene MDR1 funcionam como bombas de efluxo celular, conferindo uma resistência intrínseca a uma variedade de medicações em várias espécies de procariontos e eucariotos (camundongos, ratos, bovinos, macacos, humanos), ao exportá-los para fora da célula.

A P-gp possui um amplo espectro de substratos como antiparasitários (ivermectina), antineoplásicos (doxorubicina, vincristina, vimblastina), glicocorticóides (cortisol, dexametasona, metilprednisolona), analgésicos (morfina), glicosídeos cardíacos (digoxina) e outros (aldosterona, ondansetrona, tacrolimus, tetraciclina, eritromicina, cetoconazol, itraconazol, fenotiazídicos, ciclosporina) (PAPICH, 2009), sendo, pois, considerada como um dos maiores determinantes da variação de absorção oral e disponibilidade de diversos fármacos (CUMMINS et al., 2003).

A inibição farmacológica da P-gp demonstrou melhora da bioviabilidade oral dos fármacos substratos desta proteína (MEALY, 2004). A modulação da P-gp pode explicar alguns efeitos adversos no sistema nervoso central, induzidos por alguns fármacos administrados por via intravenosa, e a pobre resposta quando a administração se dá de forma enteral.

Existem substâncias que, mesmo não sendo substratos para a P-gp, podem inibir a sua ação, resultando em um possível aumento da absorção dos substratos (NATALINI et al, 2006). Devido a alguns dos moduladores da P-gp serem substratos para a bomba, altas concentrações destes compostos podem ser necessárias para potencializar o acúmulo de drogas citotóxicas em células que superexpressam a P-gp.

Embora tenha sido detectada inicialmente em células tumorais, a P-gp é expressada também em tecidos normais como intestino, fígado, rins, siste-

ma digestório, medula espinhal (NATALINI et al., 2006), pulmões (GONZALES, 2006), membranas hemoplacentária e barreira hematoencefálica, onde possui importante papel, por atuar como uma proteção do organismo a diversos xenobióticos (NATALINI et al., 2006). No fígado e rins a atividade da P-gp está relacionada à eliminação das drogas, enquanto que no intestino reduziria a sua absorção.

A P-gp vem ganhando relevância clínica particular em função, justamente, de sua expressão limitar o acesso das drogas ao cérebro e interferir na absorção intestinal quando da administração por via oral (MEALY, 2004; LINARDI; NATALINI, 2006) e o conseqüente reflexo prático de tal evento, em especial, a toxicidade e a resistência a drogas.

Considerando a interferência do gene MDR1 e a capacidade da P-gp em induzir a resistência a drogas, estudos farmacogenômicos têm ganhado relevância clínica também no tratamento de certos tumores. A avaliação genotípica dos pacientes tem se mostrado como uma nova ferramenta para prever a capacidade individual sobre a metabolização de drogas (IERI et al., 2004) e o possível resultado terapêutico esperado naquele paciente frente a um fármaco específico.

Algumas raças de animais são mais sensíveis a determinadas medicações. A sensibilidade à ivermectina (um antiparasitário amplamente usado na medicina veterinária e também na humana) é um exemplo clássico. Desde a década de 80 observa-se que mesmo doses muito reduzidas provocam reações adversas graves em alguns, porém, não em todos os indivíduos, sendo que algumas raças de cães como o Collie e raças aparentadas (Australian Shepard, Pastor de Shetland, Border Collie, Bearded Collie) e ainda outras como Old English Shepdog, Pastor Australiano, Pastor Alemão, dentre

outras apresentam maior incidência de intoxicação pelo uso da ivermectina.

A proporção de animais da raça Collie, citada na literatura que apresentam ou não sinais clínicos de intoxicação, respectivamente, foi de 66% e 33% aproximadamente.

Atualmente correlaciona-se esta sensibilidade aos fármacos a uma mutação de deleção na sequência genética, denominada mutação MDR1-1 Δ ou MDR1-nt230(del4). Estudos mostram que diversas raças de cães com origem comum, possivelmente de um cão da raça Australian Shepard podem apresentar esta mutação (FECHT et al., 2007).

Nos caninos este gene localiza-se no cromossomo 14, sendo que a sensibilidade à ivermectina é associada, até o presente momento, aos indivíduos homozigotos para uma deleção de quatro pares de bases (pb) no éxon quatro deste cromossomo, resultando em uma série de códons de terminação prematuras, o que origina uma proteína com número bastante reduzido de aminoácidos (90% da sequência de aminoácidos da P-gp não é expressada) e conseqüentemente esta se apresenta inativa.

A hipótese existente sugere que os portadores de um ou dos dois alelos mutados (heterozigotos e homozigotos mutados, respectivamente) têm uma maior permeabilidade da barreira hematoencefálica às moléculas, permitindo a passagem e chegada da ivermectina ao encéfalo e a conseqüente intoxicação. Enquanto que os indivíduos homozigotos não-mutados apresentam a correta tradução do gene MDR1 em P-gp funcional, o que não permite a passagem das moléculas de ivermectina através da barreira hematoencefálica, resultando na resistência à intoxicação nesses animais.

Este trabalho objetivou definir o *status* gênico de 14 cães da raça Collie frente ao gene MDR1.

MATERIAL E MÉTODOS

Neste estudo foram utilizados 14 cães da raça Collie, hípidos, adultos, e de peso corpóreo semelhante, sendo todos de propriedades particulares (estando devidamente autorizados a participarem do estudo), vermifugados dois meses antes do experimento com vermífugo oral de amplo espectro administrado e repetido em 15 e 21 dias, vacinados e recebendo água potável *ad libitum* e ração comercial para cães adultos. Uma semana antes do experimento todos os animais foram examinados clinicamente através de exame físico, exames complementares de sangue e parasitológico de fezes (EPF), garantindo sua aptidão física para o experimento. Os animais permaneceram em suas propriedades durante a fase de identificação do *status* gênico.

Foram coletados 3ml de sangue como amostra de cada animal. As coletas foram realizadas nas propriedades, acondicionadas em frascos criogênicos com ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) e mantidos sob refrigeração para envio ao laboratório, onde foram congeladas e armazenadas a 20° Celsius negativos.

No estudo *in vitro*, o DNA genômico foi extraído a partir das amostras de sangue coletado, pela técnica de extração de DNA descrita por Miller (1988) e posteriormente armazenado a -20°C.

O gene MDR1 foi detectado na forma de DNA genômico após amplificação do fragmento de interesse através da técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). As PCRs foram realizadas a partir de 1 µL de DNA, isolado de cada amostra sanguínea.

Para a reação foram utilizados os *primers forward* 5' – GGT TTG ATA GGT TGT ATA TGT TGG TG - 3' e *reverse* 5' – ATT ATA ACT GA AAA GTT TTG TTT – 3'. A partir destes *primers* foram gerados fragmentos com 144 pares de bases (pb) para os animais com os alelos mutantes, fragmentos de 148 pb para os indivíduos que têm o gene MDR1 não-mutante (tipo selvagem), e ambos fragmentos nos heterozigotos. Para a reação foi utilizado tempo de anelamento/*melting* de 1 minuto a 55°C, em 32 ciclos (FECHT et al., 2007). Posteriormente, foi realizada eletroforese vertical dos produtos da PCR em gel de poliacrilamida 30% e análise visual das bandas após fixação em ácido acético e coloração com nitrato de prata (AgNO₃).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram identificados um dos 14 indivíduos como sendo homozigoto para a mutação (única banda com 144 pb), oito heterozigotos (presença de duas bandas, sendo uma com 144 pb e a outra com 148 pb) e cinco indivíduos homozigotos não mutantes (única banda representante dos alelos selvagens/normais com 148 pb).

Obteve-se, portanto, um percentual, respectivamente, de 7%, 57% e 36% de prevalência nas 14 amostras analisadas.

Foi possível observar que 64% desta população apresentaram a mutação em pelo menos um dos alelos. Enquanto que 36% estavam livres da mutação neste gene.

Relacionando estes resultados aos dados clínicos referenciados pela literatura, sobre o percentual da

incidência de sintomatologia clínica de intoxicação nesta raça, sugere que a distribuição genômica do MDR1, manteve-se proporcional nesta população estudada.

Populações de animais aparentemente similares podem apresentar diferentes reações a uma terapia idêntica. Essa resposta clínica variável pode ser devida, em muitos casos, a fatores genéticos.

Atualmente as avaliações são baseadas apenas no fenótipo dos indivíduos, observando-se a relação entre as reações medicamentosas e raça, idade, ambiente e sexo.

Entretanto, em breve esta conduta deverá ceder espaço à triagem genotípica dos pacientes potencialmente em risco.

Com os conhecimentos farmacogenéticos, farmacogenômicos e *screening tests* é possível identificar indivíduos com sequências de DNA alterado em vias poligênicas, responsável por determinada reação adversa a um medicamento específico, o que permitirá modificar a conduta terapêutica em tempo real, visando a minimização das reações adversas e a maximização dos benefícios terapêuticos.

CONCLUSÃO

A população estudada de cães da raça Collie apresentou a proporção de mutações para o gene MDR1 similar ao observada em outros grupos de animais da mesma raça. Novos experimentos estão sendo realizados observando o comportamento clínico dos animais, contendo ou não a mutação, frente aos tratamentos quimioterápicos.

REFERÊNCIAS

CUMMINS, C. L. et al. In vivo modulation of intestinal CYP3A metabolism by P-glycoprotein: Studies using the rat single-pass intestinal perfusion model. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, Baltimore, v. 305, n. 1, p. 306-314, 2003.

FECHELT, S. et al. Analysis of the Canine MDR1-1Δ Mutation in the Dog Breed Elo. **J. Vet. Med.**, p. 401-405, 2007.

GONZALES, T. P. **Polimorfismos Moleculares do Gene MDR1/ABCB1 em Pacientes com Lupus Eritematoso Sistêmico**. 2006. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2006.

IERI, I et al. The MDR1 (ABCB1) gene polymorphism and its clinical implications. **Clinical Pharmacokinetics**, New York, v. 49, n. 9, p. 553-756, 2004.

LINARDI, R. L.; NATALINI, C. C. Influência do gene de resistência múltipla (MDR1) e da P-glicoproteína na farmacocinética e farmacodinâmica de drogas terapêuticas, **Ciência Rural**, v. 36, n. 1, p. 336-341, 2006.

MEALEY, K. L. Therapeutic implications of MDR-1 gene, **J. Vet. Pharm. Therap**, Baltimore, v. 27, p. 257-264, 2004.

MIUZO, N. et al. Impact of drug transporter studies on drug discovery and development. **Pharmacological Reviews**, St. Louis, v. 55, n. 3, p. 425-461, 2003.

NATALINI, C. C.; CUNHA, A. F.; LINARDI, R. L. Multi-drug resistance gene (MDR1) and

opioid analgesi in horses. **Ciência Rural**, v. 36, n. 1, 2006.

PAPICH, M. G. **Manual Saunders Terapêutico Veterinário**. 2. ed. São Paulo: MedVet, 2009.

WANDEL, C. et al. Interaction of morphine, fentanyl, sufentanil and loperamide with the efflux drug transporter P-glycoprotein. **Anesthesiology**, Philadelphia, v. 96, n. 4, p. 913-920, 2002.