

PCR MULTIPLEX PARA DETECÇÃO DE POLIMORFISMO NO GENE MDR1 EM CÃES

Mateus Lotério Coelho¹, Angélica Oliveira da Silva¹, Rodrigo Leite Soares², Eronides Marques de Souza², Carlos Alberto do Nascimento Ramos³.

1. Graduando(a) em Medicina Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (FAMEZ-UFMS)

2. Pós-graduando(a) do Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias da UFMS

3. Professor da FAMEZ-UFMS

Resumo

A glicoproteína-P (P-gp) é uma proteína transmembrana codificada pelo gene de resistência a múltiplas drogas (MDR1), e atua como bomba de efluxo, protegendo as células. No entanto, uma deleção no gene MDR1 (nt230, del 4), foi reconhecida em cães por estar associada a casos de hipersensibilidade a anti-helmínticos, opióides, antibióticos e outros medicamentos. O objetivo desse estudo foi desenvolver uma PCR multiplex para detecção dos genótipos do referido gene em cães.

Vinte e sete amostras de sangue de cães, sendo 17 heterozigotos (+/-); cinco homozigotos mutantes (+/+) e cinco homozigotos selvagens (-/-), identificados por meio de PCR alelo-específica, foram usadas para padronizar a PCR multiplex. A técnica padronizada neste estudo simplifica a genotipagem dos animais, revelando-se uma alternativa simples, econômica e eficiente para discriminação alélica do gene MDR1, podendo ser utilizada em estudos epidemiológicos, triagem terapêutica e seleção genética.

Palavras-chave: DNA; genotipagem; glicoproteína-P.

Introdução

Glicoproteína P (P-gp) é uma proteína transmembrana que atua como bomba de efluxo de fármacos nos organismos, é um membro da família carreadora chamada *ATP-binding cassette* (ABC). Essa proteína é codificada pelo gene de multirresistência às drogas (MDR1), também conhecido como gene ABC1 (Dean, 2005).

O gene é expresso em vários órgãos, como intestino, fígado, rim, medula espinhal, cérebro, pulmão, testículos e placenta. A proteína codificada atua na eliminação de xenobióticos e metabólitos celulares, como barreira protetora, limitando a absorção intestinal e restringindo a entrada de drogas nos tecidos, especialmente o sistema nervoso central (Fromm, 2004; Linardi & Natalini, 2006). Drogas e substratos para P-gp comumente utilizados em medicina veterinária incluem: ivermectina, digoxina, loperamida, vinblastina, ciclosporina, paclitaxel, verapamil, doxorubicina e dexametasona (Geyer *et al.*, 2005).

Em cães, quando ocorre uma deleção de quatro pares de bases (4pb-AGAT) no nucleotídeo 230, mutação nt230 (del4) do gene MDR1, localizado no cromossomo 14, há a formação de uma P-gp afuncional (Gramer *et al.*, 2011). O declínio de P-gp funcional leva ao aumento da biodisponibilidade do fármaco e redução de sua eliminação pelo intestino, fígado e rins, causando acúmulo intracelular e condições clínicas graves, como a neurotoxicidade. Os sinais em cães incluem hipersalivação, ataxia, cegueira, midríase, letargia, dificuldade respiratória, depressão, tremores, convulsões e morte (Hopper *et al.*, 2002).

Geralmente, a genotipagem é realizada por meio de técnicas moleculares como a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) visualizada após eletroforese em gel de poliacrilamida (Roulet *et al.*, 2003; Geyer *et al.*, 2005; Kawabata *et al.*, 2005); PCR em tempo real (qPCR) (Klitzsch *et al.*, 2010) e PCR alelo-específica (Baars *et al.*, 2008; Asawakarn *et al.*, 2012). No entanto, estas técnicas podem gerar dificuldades na visualização e interpretação dos resultados, requerer equipamentos e reagentes de custo elevado ou necessidade de mais de uma reação para a genotipagem de cada indivíduo, aumentando o tempo e custos do diagnóstico.

Portanto, no presente estudo objetivou-se desenvolver uma PCR Multiplex para otimizar a genotipagem do gene MDR1 em cães.

Metodologia

Para a padronização da PCR Multiplex, foram utilizadas 27 amostras de DNA extraídas de sangue de cães e pertencentes ao banco de DNA do Laboratório de Biologia Molecular da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (FAMEZ/UFMS). Destas, 17 eram heterozigotos (+/-); cinco homozigotos selvagens (+/+) e cinco homozigotos mutantes (-/-), identificados por meio de PCR alelo-específica, seguindo metodologia descrita por Asawakarn *et al.* (2012).

Para desenvolver os ensaios da PCR multiplex foram avaliadas diferentes concentrações de MgCl₂ (1-3 mM), desoxinucleotídeos (0,2-0,8 mM), primers (11-33 pmol) e temperaturas de anelamento (58-63°C). As sequências dos primers utilizados são apresentadas na Tabela 1.

Os produtos de amplificação da PCR foram visualizados sob luz ultravioleta após eletroforese em gel de agarose (1,5%) corados com GelRed (Biotium). Foi utilizado marcador molecular de 100pb (Ludwig Biotec) para mensurar os fragmentos amplificados.

Tabela 1. Primers utilizados no desenvolvimento da PCR Multiplex para detecção do gene MDR1 em cães.

Primer	Sequência (5'-3')	Tamanho (pb)	Referência
MDR1 Mut-F MDR1 Mut-R	GGTTTTTGGAAACATGACAGC AGAGCCCAACCTGTGACAAT	577	Asawakarn <i>et al.</i> , 2012
MDR1 Norm-F MDR1 Norm-R	GCTGGTTTTTGGAAACATGACAGA TCCTGAAACTTCCTGGGATCT	341	Asawakarn <i>et al.</i> , 2012

Os resultados de sensibilidade e especificidade da PCR multiplex foram comparados com os resultados da PCR alelo-específica (27 amostras) pelo coeficiente Kappa, utilizando software BioEstat 5.0® (Ayres *et al.*, 2007).

Resultados e Discussão

As reações de PCR Multiplex foram otimizadas em um volume final de 25 µL, contendo 10 mM Tris-HCL (pH 8,3), 50 µM de KCl, 3,0 mM MgCl₂, 0,6 mM de cada desoxinucleotídeo (dNTP), 22 pmol de cada primer, 2,5 U de Taq DNA-polimerase (Ludwig Biotec) e aproximadamente 100 ng de DNA genômico. O protocolo térmico otimizado consistiu em uma etapa de desnaturação inicial a 94°C durante dois minutos, seguida por 40 ciclos a 94°C durante 15 segundos, anelamento a 62°C por 30 segundos e extensão a 72°C por 45 segundos. Uma extensão final a 72°C durante cinco minutos foi realizada.

Após a padronização do protocolo de PCR multiplex, utilizando as 27 amostras de sangue de cães previamente genotipadas, a análise comparativa dos dados obtidos teve concordância de 100% (coeficiente Kappa = 1,0). Foi possível visualizar e diferenciar simultaneamente os homozigotos e heterozigotos, representados na figura 1.

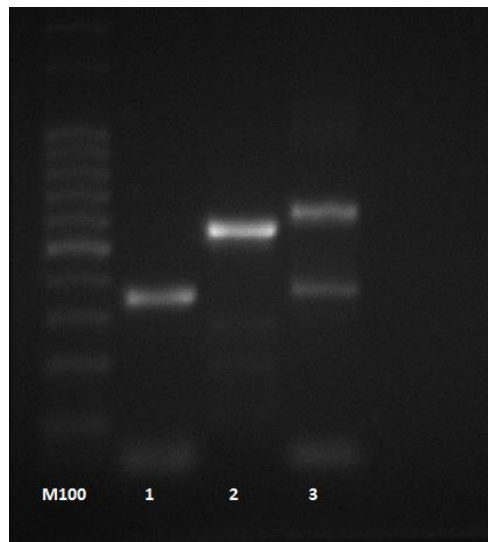


Figura 1- Homozigotos e heterozigotos para o gene MDR1 detectados por PCR multiplex, visualizados após eletroforese em gel de agarose 1,5%. M100 representa um marcador molecular de 100 pb (Ludwig Biotec); Fragmentos de 341, são demonstrados na coluna 1 e representam homozigoto selvagem (+/+); Na coluna 2, fragmentos de 577 pb representa homozigoto mutante (-/-), e ambos fragmentos de 341 e 577 pb, são visualizados em indivíduo heterozigoto (+/-) na coluna 3.

Diversos estudos utilizaram a PCR convencional para discriminação alélica da deleção de 4 pb no gene MDR1, pela visualização de fragmentos de 138 e 134 pb (Neff *et al.*, 2004; Geyer *et al.*, 2005); 69 e 65 (Roulet *et al.*, 2003); 60 e 56 pb (Kawabata *et al.*, 2005), após eletroforese em gel de poliacrilamida. No entanto, diferenciar dois produtos de PCR que diferem em apenas 4 pb é uma tarefa difícil (Baars *et al.*, 2008) e onerosa, uma vez que demanda a utilização de reagentes e equipamentos mais complexos e mais tempo para execução.

Por outro lado, a mutação no gene MDR1 pode ser detectada rapidamente utilizando qPCR (Klitzsch *et al.*, 2010). Este método demonstrou ser confiável, específico, prático, rápido e seguro. No entanto, requer equipamentos e reagentes mais dispendiosos.

A utilização de reações distintas de PCR para distinguir o genótipo de MDR1 em alelos selvagens e mutantes, pelo tamanho de fragmentos de 300 e 500 pb (Baars *et al.*, 2008) e 341 e 577 pb (Asawakarn *et al.*, 2012) é simples, acurado e robusto, sendo possível a visualização dos resultados após eletroforese em gel de agarose. No entanto, requer a confecção de mais de uma reação para a genotipagem de cada indivíduo, duplicando os custos para tal.

No presente estudo, a padronização da PCR multiplex otimizou a detecção dos diferentes genótipos de MDR1, utilizando um único ensaio de PCR por amostra e uma única condição de termociclagem, possibilitando ainda a visualização dos resultados após eletroforese em gel de agarose. Essa metodologia mostrou-se de fácil execução e interpretação e ainda menos onerosa do que os procedimentos citados anteriormente.

Sabe-se que a maioria dos cães com reações adversas a medicamentos é homocigota para a mutação no gene MDR1, e os animais heterocigotos também podem ser afetados, principalmente com doses crescentes de substrato (Dowling, 2006). Neste contexto a genotipagem se torna importante tanto para seleção de protocolos terapêuticos como para determinação da dose dos fármacos. No entanto, ainda são necessários mais estudos associando o diagnóstico molecular e o acompanhamento clínico e preventivo de intoxicações.

Estudos de genotipagem indicam que o alelo MDR1 mutante (-) pode ser conservado por gerações, e que cães de raça pura são os mais afetados, principalmente Collies, Shetland Sheepdog, Pastor Australiano, Silken Windhound e o Pastor Alemão (Nelson *et al.*, 2003; Mealey *et al.*, 2005). Por conta disso, nos EUA, e Alemanha estabeleceu-se a necessidade de se averiguar o genótipo MDR1 em raças predispostas antes do tratamento, como triagem terapêutica (Klitzsch *et al.*, 2010).

Apesar das desvantagens conhecidas, foi verificado em ratos NMRI *nu/nu* que indivíduos mutantes para o gene MDR1, apresentando tumores cerebrais e testiculares, responderam melhor a quimioterapia do que os indivíduos não mutantes (Fellner *et al.*, 2002). Portanto, o diagnóstico molecular também poderia ser aplicado para o estabelecimento do prognóstico do paciente oncológico.

Além disso, devido à mutação ser transmitida para descendentes, torna-se também importante a identificação de animais portadores do alelo mutante e sua retirada da reprodução para aprimoramento das raças em programas de melhoramento genético (Neff *et al.*, 2004).

Conclusões

A técnica baseada em PCR multiplex padronizada simplifica a genotipagem dos cães. O método revelou ser uma alternativa simples, econômica e sensível para discriminação alélica do gene MDR1, podendo ser utilizada em estudos epidemiológicos, na triagem terapêutica e seleção genética.

Referências bibliográficas

- Asawakarn, S., Ruangchaprakarn, V., Srisowanna, N., *et al.* (2012). **Determination of Multidrug Resistance (MDR1) Gene and its Mutations in Dogs by using Polymerase Chain Reaction.** *Thai J. Vet. Med.*, 42(1), 37-42.
- Baars, C., Leeb, T., von Klopmann, T., *et al.* (2008). **Allele-specific polymerase chain reaction diagnostic test for the functional MDR1 polymorphism in dogs.** *Vet J.*, 177: 394-397.
- Dean, M. (2005). **The genetics of ATP-binding cassette transporters.** *Methods in Enzymology*, 400, 409–429.
- Dowling, P. (2006). **Pharmacogenetics: It's not just about ivermectin in collies.** *Clinical Pharmacology Update*, 47, 1165-1168.
- Fellner, S.; Bauer, B.; Miller, D.S.; Schaffrik, M.; Fankhanel, M.; Spruss, T.; Bernhardt, G.; Graeff, C.; Farber, L.; Gschaidmeier, H.; Buschauer, A.; Fricker, G. (2002). **Transport of paclitaxel (Taxol) across the bloodbrain barrier in vitro and in vivo.** *Journal of Clinical Investigation*, v.110, p.1309- 1318.
- Fromm, M. F. (2004). **Importance of P-glycoprotein at blood-tissue barriers.** *Trends in Pharmacological Sciences*, 25, 8, 423-429.
- Geyer, J., Döring, B., Godoy, J. R., Leidolf, R., Moritz, A., Petzinger, E. (2005). **Frequency of the nt230 (del4) MDR1 mutation in Collies and related dog breeds in Germany.** *J. Vet. Pharmacol Ther.*, 2, 545-551.
- Geyer, J., Döring, B., Godoy, J.R., Moritz, A. & Petzinger, E. (2005b). **Development of a PCR-based diagnostic test detecting a nt230 (del4) MDR1 mutation in dogs: verification in a moxidectin-sensitive Australian Shepherd.** *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 28, 95–99.
- Gramer, I., Leidolf, R., Döring, B., Klitzsch, S., *et al.* (2011). **Breed distribution of the nt230 (del4) MDR1 mutation in dogs.** *The Veterinary Journal*, 189 (1), 67-71.
- Hopper, k., Aldrich, J., Haskins, S.C. (2002.) **Ivermectin toxicity in 17 collies.** *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 16, 89-94.
- Kawabata, A., Momoi, Y., Inoue-Murayama, M., Iwasaki, T. (2005). **Canine mdr1 gene mutation in Japan.** *J. Vet. Med. Sci.*, 67, 1103-1107.
- Klitzsch, S., Meerkamp, K., Döring, B. & Geyer, J. (2010). **Detection of the nt230[del4] MDR1 mutation in dogs by a fluorogenic 5' nuclease TaqMan allelic discrimination method.** *Vet J.* 185: 272-277.
- Linardi, R.L. & Natalini, C.C. (2006). **Influência do gene de resistência múltipla (MDR1) e da P-glicoproteína na farmacocinética e farmacodinâmica de drogas terapêuticas.** *Ciência Rural*, 36, 1, 336-341.
- Neff, M.W., Robertson, K.R., Wong, A.K., *et al.* (2004). **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*, 101, 32, 11725-11730.
- Nelson, O. L., Carsten, E., Bentjen, S.A., Mealey, K.L. (2003). **Ivermectin toxicity in na Australian Shepherd dog with the MDR1 mutation associated with ivermectin sensitivity in Collies.** *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 17, 354–356.

Roulet, A., Puel, O., Gesta, S., *et al.* (2003). **MDR1-deficient genotype in Collie dogs hypersensitive to the P-glycoprotein substrate ivermectin.** *Eur J Pharmacol.* 460: 85-91.