

13ª JORNADA DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA

BIOMEDICINA

PESQUISA DE BIOMARCADORES EM CÃES COM ENFOQUE EM FARMACOGENÉTICA: ESTUDO DOS GENES ABCB1 (MDR1) E CBR1

¹ Paulo Victor Simões de Freitas (IC-Unirio); ² Tábata Maués (Doutorado-CAPES); ³ Franciele Basso Fernandes Silva (Doutorado-CAPES); ² Maria de Lourdes Gonçalves Ferreira (Pesquisador/Colaborador); ² Ana Maria Reis Ferreira (Pesquisador/Colaborador); ⁴ Liane de Castro (Pesquisador/Colaborador); ¹ Kênia Balbi El-Jaick (Orientador).

1 - Departamento de Genética e Biologia Molecular; Instituto Biomédico; Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro.

2 - Departamento de Clínica e Reprodução Animal; Faculdade de Veterinária; Universidade Federal Fluminense.

3 - Departamento de Patologia; Faculdade de Medicina; Universidade Federal Fluminense.

4 - Laboratório de Pesquisa em Farmacogenética; Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas; Fundação Oswaldo Cruz.

Apoio Financeiro: FAPERJ, FIOCRUZ.

Palavras-chave: farmacogenética, biomarcadores, gene MDR1, gene CBR1, genotipagem, espécie canina.

INTRODUÇÃO

Sabe-se, atualmente, que polimorfismos em genes envolvidos com a absorção, metabolismo ou eliminação dos diversos fármacos influenciam na resposta terapêutica do paciente de diferentes maneiras. Portanto, é de interesse médico veterinário que testes de genotipagem para a identificação de polimorfismos nestes genes sejam desenvolvidos, de modo a escolher o melhor tratamento (fármaco e doses) em diferentes casos. Dentre eles, os genes MDR1 (do inglês, Multidrug Resistance 1, ou também chamado ABCB1) e CBR1 (do inglês, Carbonyl Reductase 1) mostraram evidências de sua importância em pesquisas em farmacogenética realizadas na espécie canina e humana. Na literatura há um grande número de relatos de neurotoxicidade após a terapia com o fármaco ivermectina, principalmente em cães da raça Collie, portadores de uma deleção de quatro pares de base no gene MDR1, em homozigose (Neff et al., 2004; Baars et al., 2008; Gramer et al., 2011). Localizado no cromossomo 14 de canídeos, o gene MDR1 é responsável pela codificação da Glicoproteína P (Pgp). A Pgp é responsável pelo transporte de diversas classes de fármacos em tecidos como intestino delgado, fígado, rins, barreira hematoencefálica, barreira testicular e placenta, limitando a absorção e promovendo a eliminação destas. Do mesmo modo, o gene CBR1 é responsável pela formação da carbonil redutase 1, importante na metabolização de substratos farmacológicos relevantes como o anticâncer doxirubicina. Estudos realizados no gene CBR1 em humanos associaram a presença de dois polimorfismos com um risco aumentado para cardiotoxicidade induzida por antraciclina (Bains et al., 2009). Posteriormente, estudos realizados na espécie canina também sugerem a participação de variantes da enzima CBR1 como causa da cardiotoxicidade apresentada por cães após a terapia anticancer com antraciclina, visto que polimorfismos também vêm sendo descritos no gene CBR1 canino (Cheng et al., 2012). Mediante a necessidade de se identificar biomarcadores com relevância clínica para a farmacogenética, é de fundamental importância que sejam desenvolvidos métodos de genotipagem eficientes, rápidos, de baixo custo e que sejam aplicáveis à rotina médica. A partir da implantação da terapia personalizada, tanto em humanos como em animais, será possível prever a resposta diferenciada a um determinado fármaco de acordo com o perfil genético individual e, deste modo, poder selecionar o fármaco e a dose mais adequados para cada indivíduo e assim prevenir a ocorrência de reações adversas e falhas terapêuticas.

OBJETIVO

Este projeto tem o objetivo de desenvolver e padronizar metodologias de genotipagem de polimorfismos presentes nos genes MDR1 e CBR1 de cães, assim como, de identificar e descrever os polimorfismos encontrados em amostras de DNA de cães.

METODOLOGIA

A extração de DNA de amostras biológicas de cães foi realizada com a utilização do kit comercial DNAeasy Blood & Tissue (Qiagen, CA), segundo instruções do fabricante. Para o estudo de biomarcadores de interesse em farmacogenética, analisamos inicialmente o éxon 4 do gene MDR1, buscando identificar uma deleção de quatro pares de bases (pb) em amostras de DNA canino por meio da técnica de Reação em Cadeia de Polimerase (PCR) utilizando oligonucleotídeos alelo-específicos (ASO, do inglês allele-specific oligonucleotide). Seguindo o mesmo desenho experimental de Baars e colaboradores (2008), uma PCR utilizando os oligonucleotídeos PgpA (senso), PgpB (senso alelo específico) e PgpD (reverso) foi realizada para a amplificação específica do alelo selvagem e uma segunda PCR utilizando os oligonucleotídeos PgpA (senso), PgpC (senso alelo específico) e PgpD (reverso) foi realizada para a amplificação específica do alelo mutante (com deleção de 4 pb). Para o estudo adicional do gene MDR foram analisados os éxons 6, 9 e 26 visando a identificação de polimorfismos já descritos na espécie canina. O gene CBR1 foi o segundo alvo de estudo, entretanto, por apresentar apenas três éxons, a análise incluiu toda a sequência codificadora. O desenho experimental iniciou com o desenho de oligonucleotídeos para a amplificação por meio da PCR dos éxons descritos acima, assim como de regiões de limite íntron-éxon. O desenho dos oligonucleotídeos para a amplificação das sequências dos genes MDR1 e CBR1 foi realizado com a utilização de ferramentas de bioinformática no laboratório de Genética da Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro (UNIRIO). As sequências gênicas utilizadas neste estudo foram selecionadas a partir dos bancos de dados disponíveis gratuitamente em endereços eletrônicos (on line), tais como "National Center for Biotechnology Information" (NCBI), "University of California, Santa Cruz" (UCSC Genome Browser) e "The European Bioinformatics Institute", parte do "European Molecular Biology Laboratory" (ENSEMBL). Após a seleção das sequências consenso, o

13ª JORNADA DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA

desenho de oligonucleotídeos espécie-específicos (para amplificação das sequências de DNA de cães) foi realizado seguindo alguns princípios básicos, quando possível: (a) temperaturas de anelamento dos oligonucleotídeos em torno de 56°C até 65 graus Celsius; (b) tamanho entre 20-26 nucleotídeos; (c) a existência de poucas sequências repetitivas ou a ausência delas; (d) valores percentuais próximos das bases nitrogenadas Citosina e Guanina (C-G) em relação a Timina e Adenina (T-A); e (e) a presença de pelo menos uma Citosina ou Guanina na extremidade 3' do oligonucleotídeo. Visando prever o desempenho dos oligonucleotídeos desenhados e, desta forma, evitar a amplificação de sequências inespecíficas, foram utilizadas ferramentas de pesquisa de regiões de similaridade entre sequências, tais como "BLAST – Basic Local Alignment Search Tool" e a ferramenta de PCR in silico (UCSC Genome Browser). Os oligonucleotídeos que demonstraram evidências de amplificações específicas foram enviados para síntese. O protocolo de todos os ensaios foram realizados inicialmente considerando-se um volume final total de 20 µL, contendo 5 µL do DNA extraído de amostras biológicas de cães (~100ng de DNA); 2 µL de tampão de reação 10x (Composição do tampão: 200 mM Tris HCl (pH 8.4), 500 mM KCl – Invitrogen Carlsbad, CA); 2 µL de dNTP's (2 mM – Invitrogen, Carlsbad, CA); 0,6 µL de MgCl₂ (concentração a 50 mM – Invitrogen, Carlsbad, CA); 1 µL de cada um dos oligonucleotídeos (concentração a 20 pmol – IDT - Integrated DNA Technologies); 0,25 µL de enzima Taq DNA Polimerase (5U/µL – Invitrogen, Carlsbad, CA); completando o volume com água deionizada estéril. Todas as amplificações foram realizadas em um termociclador Mastercycler Gradient® 96 poços (Eppendorf, AG, Germany) nas seguintes condições: um ciclo inicial de desnaturação a 95°C por 5 min, seguido de 35 ciclos de 3 etapas cada, uma de desnaturação à 95°C por 1 min, uma de anelamento, com gradiente de temperatura de 56°C à 65°C por 1 min e 15 segundos, uma de extensão à 72°C por 1 min, com uma etapa de extensão final de 72°C por 7 min. Após a reação, 5 µL dos produtos gerados pela PCR foram visualizados em géis de agarose a 1,5% em tampão TAE 1X, para verificação da amplificação do fragmento alvo. Para a visualização dos amplicons, o GelRed™ (Biotium) foi utilizado como corante intercalante de DNA. Para a identificação da deleção de 4 pb do éxon 4 do gene MDR1 era esperada a visualização de bandas de 326 pb utilizando os primers PgpA, PgpC e PgpD; e para a identificação do alelo selvagem eram esperadas bandas de 326 pb utilizando os primers PgpA, PgpB e PgpD. Além disso, uma banda de 483 pb (ou 479 pb, em indivíduos portadores da deleção de 4pb) era esperada em todos os produtos de PCR, visto que representa um controle interno, confirmando a amplificação da sequência alvo. Os demais produtos de PCR, amplificados com cada par de oligonucleotídeos desenhados para este estudo, foram avaliados quanto à especificidade considerando a análise do resultado dos gradientes de temperatura, possibilitando a escolha da temperatura de anelamento mais adequada.

RESULTADOS

O estudo da deleção de 4pb no gene MDR1 foi realizado em amostras de DNA de 12 cães. Considerando a análise dos produtos de PCR com a utilização de um gradiente de temperatura foi possível selecionar a mesma temperatura de anelamento (61°C) para a identificação de ambos alelos, mutante e selvagem, diferindo das temperaturas utilizadas por Baars e colaboradores (2008), os quais utilizaram 61°C para a identificação do alelo mutante e 57°C para o selvagem. A vantagem desta padronização é a possibilidade de realização de ambas PCRs em um mesmo termociclador, ao mesmo tempo, conseguindo com maior rapidez os resultados da genotipagem, identificando os indivíduos homozigotos portadores da deleção, os homozigotos selvagens e os heterozigotos por meio de um único experimento. Entretanto, nenhum portador do alelo mutante foi identificado. Confirmando estes resultados, todas as amostras apresentaram resultados positivos para o alelo selvagem, revelando o genótipo homozigoto selvagem em todos os cães estudados. Estes achados poderiam ser justificados pela raça dos cães analisados. A grande maioria dos animais estudados era sem raça definida e este polimorfismo se apresenta com maior frequência em cães de raça como Collie (NEFF e colaboradores, 2004), mais raramente encontrados na população de cães do Rio de Janeiro. Portanto, um maior número de cães deverá ser analisado, para que seja possível identificar cães portadores deste alelo mutante do gene MDR1. A análise dos produtos de PCR resultado da amplificação dos éxons 6, 9 e 26 do gene MDR1 e dos três éxons do gene CBR1, também com a utilização de um gradiente de temperatura, possibilitou confirmar a eficiência e a especificidade dos oligonucleotídeos desenhados em cinco dos seis ensaios realizados, assim como, selecionar a temperatura de anelamento mais adequada para a amplificação destas cinco sequências alvo, visando a prevenção de amplificações inespecíficas de sequências não-alvo.

CONCLUSÃO

A estratégia experimental elaborada para este projeto se mostrou bastante promissora para a identificação de biomarcadores para a pesquisa em farmacogenética na espécie canina, visto que o desenho de oligonucleotídeos para posterior PCR, com a utilização de ferramentas de bioinformática, revelou resultados satisfatórios na maioria dos ensaios realizados. Inicialmente, o sequenciamento de DNA será, sem dúvida, essencial para a identificação de variantes frequentes e posterior seleção dos biomarcadores de importância clínica. Porém, a metodologia de genotipagem em larga escala utilizando a PCR-ASO demonstrou ser um método também bastante eficiente, com a vantagem de ser menos laboriosa e de custo menos elevado que o sequenciamento de DNA. Portanto, as próximas etapas deste projeto incluirão o sequenciamento dos amplicons gerados para a identificação de variantes frequentes em algumas amostras de DNA da espécie canina e, posteriormente, o desenho de oligonucleotídeos alelo-específicos para a genotipagem em larga escala de polimorfismos nos genes MDR1 e CBR1 utilizando a técnica de PCR-ASO.

REFERÊNCIAS

- ADAMS RD, VICTOR M. Multiple sclerosis and allied demyelinating diseases. In: Principles of Neurology. 4:755-774, 1989.
- BAARS, C.; LEEB, T.; VON KLOPMANN, T.; TIPOLD, A.; POTSCHKA, H. Allele-specific polymerase chain reaction diagnostic test for the functional MDR1 polymorphism in dogs. Vet J, v. 177, n. 3, p. 394-7, Sep 2008. ISSN 1090-0233 (Print).



13ª JORNADA DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA

BAINS, O. S.; KARKLING, M. J.; GRIGLIATTI, T. A.; REID, R. E.; RIGGS, K. W. Two nonsynonymous single nucleotide polymorphisms of human carbonyl reductase 1 demonstrate reduced in vitro metabolism of daunorubicin and doxorubicin. *Drug Metab Dispos*, v. 37, n. 5, p. 1107-14, May 2009. ISSN 1521-009X (Electronic).

CHENG, Q.; SANBORN, C.; FERGUSON, D.; BLANCO, J. G. DNA sequence variants in the carbonyl reductase 1 (cbr1) gene in seven breeds of *Canis lupus familiaris*. *Genet Mol Res*, v. 11, n. 2, p. 1109-16, 2012. ISSN 1676-5680 (Electronic).

GRAMER, I. et al. Breed distribution of the nt230(del4) MDR1 mutation in dogs. *Vet J*, v. 189, n. 1, p. 67-71, Jul 2011. ISSN 1532-2971 (Electronic).

NEFF, M. W.; ROBERTSON, K. R.; WONG, A. K.; SAFRA, N.; BROMAN, K. W.; SLATKIN, M. et al. Breed distribution and history of canine mdr1-1Delta, a pharmacogenetic mutation that marks the emergence of breeds from the collie lineage. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 101, n. 32, p. 11725-30, Aug 10 2004. ISSN 0027-8424 (Print).