

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
ESCOLA DE VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

Disciplina: SEMINÁRIOS APLICADOS

FARMACOGENÉTICA:
Fundamentos e aplicações
(Revisão de literatura)

Líria Queiroz Luz Hirano
Orientador: Prof. Dr. Juan Carlos Duque Moreno

GOIÂNIA
2011

LÍRIA QUEIROZ LUZ HIRANO

FARMACOGENÉTICA:

Fundamentos e aplicações na medicina canina

(Revisão de literatura)

Seminário apresentado junto à Disciplina de Seminários Aplicados do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Escola de Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal de Goiás. Nível: Doutorado.

Área de Concentração:

Patologia, Clínica e Cirurgia Animal

Linha de Pesquisa:

Técnicas Cirúrgicas e Anestésicas, Patologia Clínica

Cirúrgica e Cirurgia Experimental

Orientador:

Prof. Dr. Juan Carlos Duque Moreno - UFG

Comitê de Orientação:

Prof. Dr. André Luiz Quagliatto Santos – FAMEV/UFU

Profª Drª Rosângela Gonçalves Peccini Machado – FCF/UNESP

GOIÂNIA

2011

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	01
2 REVISÃO DE LITERATURA	03
2.1 História da farmacogenética	03
2.2 Conceitos básicos aplicados à farmacogenética	04
2.3 Polimorfismos ligados à farmacogenética	08
2.3.1 Aspectos gerais dos polimorfismos genéticos	08
2.3.2 Farmacogenética na medicina de cães	11
2.4 Técnicas moleculares utilizadas na farmacogenética	16
2.4.1 Fase pré-analítica	17
2.4.2 Técnicas analíticas	18
2.4.2.1 Reação em cadeia pela polimerase	18
2.4.2.2 Polimorfismo do tamanho do fragmento de restrição	19
2.4.2.3 Eletroforese	19
2.4.2.4 Método dideoxi	20
2.5 A ética na farmacogenética	21
3 CONSIDERAÇÕES FINAIS	23
REFERÊNCIAS	24

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1 - Gene em segmento de ADN no modelo de dupla hélice compondo a estrutura cromossomal (Adaptado de LYNCH & WALSH, 1998) 5
- FIGURA 2 - Ligação 3'-5' fosfodiéster entre nucleotídeos de mesma fita de ADN e ligações de hidrogênio entre bases nitrogenadas de nucleotídeos de fitas de ADN distintas (Adaptado de CONN & STUMPF, 1980) 6
- FIGURA 3 - Transcrição de um ARN mensageiro maduro a partir de éxons de um ARN primário (Adaptado de SOUTO et al., 1997) 7
- FIGURA 4 - Genes alelos ocupando o mesmo loco em cromossomos homozigotos e heterozigoto (Adaptado de <http://biologia1.blogspot.com/2008/07/gentica.html>, 2011) 8
- FIGURA 5 - Comparação entre indivíduos com metabolismos lento (vermelhos), intermediário (azul) e rápido (cinza) em relação à eficiência e ocorrência de efeitos adversos à mesma dose de determinado fármaco (Adaptado de METZGER et al., 2006)..... 10
- FIGURA 6 - Divisão de 85 raças caninas entre quatro grupos de acordo com perfis genéticos. Raças circundadas pela linha azul possuem características semelhantes aos Mastiffs; linha vermelha, aos cães de caça; linhas verde e amarela indicam cães com perfil pastoreio e asiático, respectivamente (Adaptado de PARKER et al., 2004) 13

LISTA DE ABREVIATURAS

ADN	ácido desoxirribonucleico
ARN	ácido ribonucleico
ARNm	ARN mensageiro
CYP	citocromo P450
dNTPs	desoxinucleotídeos
ddNTPs	didesoxinucleotídeos
FDA	Food and Drug Administration
PCR	reação em cadeia da polimerase
RFLP	polimorfismo de comprimento dos fragmentos de restrição
SNP	polimorfismo de base única
VNTR	variação no número de sequências repetidas

1 INTRODUÇÃO

Pesquisas a respeito de alguns tratamentos medicamentosos em humanos demonstraram que as taxas de eficácia variam entre 25% a 80% e que, de modo geral, somente um terço dos pacientes obtém os benefícios terapêuticos desejados, enquanto no restante o princípio ativo não atua como o esperado ou é pouco tolerado (NORTON, 2001). A ocorrência de reações adversas a medicamentos constitui um problema importante para o profissional da área da saúde, pois aumenta significativamente o tempo de hospitalização e foi considerada como a quarta dentre as seis causas mais frequentes de morte de pacientes humanos nos Estados Unidos (DESTENAVES & THOMAS, 2000; PIRAZZOLI & RECCHIA, 2004).

Dentre as causas de variação na resposta individual à mesma posologia de um fármaco podem-se destacar a idade, os fatores genéticos e imunológicos, as enfermidades e a ocorrência de interações entre princípios ativos (RANG et al., 2007). A variabilidade genética pode alterar tanto a farmacodinâmica, ou seja, a relação entre a dose administrada e os efeitos produzidos, como a farmacocinética, que relaciona os eventos de absorção, distribuição, metabolismo e excreção da substância à sua concentração sistêmica (WEINSHILBOUM & WANG, 2006).

Na medicina, as particularidades genéticas foram estudadas previamente à determinação dos genes codificadores de receptores e enzimas metabolizadoras, pois já se relatavam diferenças nas respostas aos princípios ativos, relacionadas principalmente às várias etnias (PESSÔA et al., 2006). Estudos primordiais que relacionavam as variações genéticas à ação dos fármacos partiram da constatação da diversidade de respostas de pacientes tratados com as mesmas doses de certo medicamento. Posteriormente, as pesquisas associaram tais observações às diferenças nas concentrações plasmáticas ou urinárias da substância e de seus metabólitos (WEINSHILBOUM & WANG, 2006).

Uma vez que os fatores genéticos contribuem para a eficácia e a segurança de um fármaco, pesquisas a respeito da farmacogenética e farmacogenômica estão sendo fomentadas. Esses estudos avaliam as influências

genéticas sobre as respostas a medicamentos, sendo que CHOWBAY et al. (2005) afirmam que a farmacogenética se concentra nos efeitos de genes isolados, enquanto que a farmacogenômica é uma evolução da primeira e analisa simultaneamente vários genes e suas interações com alvos específicos.

As pesquisas farmacogenéticas e farmacogenômicas estão focadas na identificação de genes que predispõem às doenças, modulam respostas aos fármacos, afetam a farmacocinética e a farmacodinâmica de medicamentos e se associam às reações adversas (MUKHERJEE & TOPOL, 2003). A partir da evolução desse segmento da farmacologia clínica, espera-se revolucionar a prática médica e alcançar o que especialistas denominam de medicina personalizada, em contraposição à atual conduta terapêutica, na qual há o emprego de um mesmo fármaco e de uma mesma posologia para todos os pacientes, de acordo com o diagnóstico (JAIN, 2004).

FLEISCHER et al. (2008) afirmam que apesar do crescente interesse da medicina veterinária pelas pesquisas genômicas, principalmente ligadas à produção animal, poucas são as informações disponíveis acerca da relação entre variações genéticas e a ação dos fármacos nos animais. Entretanto, estudos com raças distintas demonstraram respostas variadas a substâncias endógenas e exógenas em bovinos (SALLOVITZ et al., 2002), ovinos (AMMOUN et al., 2006), aves (OPDYCKE & MENZER, 1984), suínos (SUTHERLAND et al., 2005) e caninos (FLEISCHER et al., 2008).

Diante da importância da variação genética na resposta aos fármacos, nesta revisão de literatura serão abordados conceitos elementares relacionados à farmacogenética e seu potencial para otimizar tratamentos. Uma vez que há pouca literatura veterinária disponível para a abordagem do tema, grande parte do recorrido será embasada em informações advindas de pesquisas em humanos.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 História da farmacogenética

BORÉM et al. (2003) resumem a trajetória do desenvolvimento de estudos genéticos em cinco fases. Como marco inicial, os autores consideram a investigação estrutural e comportamental dos cromossomos, considerados o alicerce hereditário celular. A segunda fase é marcada pela intensificação do conhecimento da base molecular hereditária que determinou a conformação do ácido desoxirribonucleico (ADN) como de dupla hélice e o definiu como responsável pela informação genética.

A terceira etapa foi regida pela tentativa inicial de leitura do código genético e a fase posterior pela decodificação dos primeiros genes com informações acerca do controle e da modulação de suas expressões. Após o sequenciamento de genomas inteiros, iniciou-se a realidade da genética atual e a mudança do protótipo da pesquisa de genes isolados para um padrão no qual o material genético é analisado como um todo (BORÉM et al., 2003).

Inicialmente, GARROD (1909), fundador da bioquímica genética, fez as primeiras sugestões de que variações metabólicas na população seriam características herdáveis aos descendentes. Mais tarde, foi divulgado um estudo em que se relatava escurecimento e ausência da formação de bolhas após o uso tópico de água oxigenada em três irmãos, dentre cinco, o que foi associado a uma herança autossômica recessiva que ocasionava deficiência da enzima catalase (TAKAHARA, 1952).

Em 1953, WATSON & CRICK descreveram a estrutura do ADN no modelo de dupla hélice. Posteriormente, MOTULSKY (1957) associou a ocorrência de reações adversas aos fármacos com alterações na determinação genética da atividade de algumas enzimas e, em 1959, VOGEL propôs a denominação do estudo dessas variações como farmacogenética. Na década de 70, demonstrou-se a semelhança no metabolismo de alguns fármacos entre gêmeos idênticos, diferente das nítidas variações que ocorriam em relação a gêmeos heterozigotos (VESELL, 1973).

Com a intenção de aplicar a tecnologia de análise do ADN na expansão do mapeamento genético, originaram-se os estudos sistemáticos de genomas completos (BOTSTEIN et al., 1980). Assim, a partir da elaboração de mapas do genoma nuclear, iniciou-se a busca pela identificação de genes específicos, sendo que o primeiro grande sucesso desta estratégia ocorreu na genética humana, com a determinação do gene causador da doença de Huntington, mapeado no cromossomo quatro (GUSELLA et al., 1983).

Na medicina veterinária o primeiro mapa genético publicado para animais domésticos foi o da galinha (*Gallus gallus*) (BUMSTEAD & PALYGA, 1992), seguido pelo do bovino (*Bos taurus*) (BISHOP et al., 1994), suíno (*Sus scrofa*) (ROHRER et al., 1994), ovino (*Ovis aries*) (CRAWFORD et al., 1995), canino (*Canis domesticus*) (PARKER & OSTRANDER, 2005) e, mais recentemente, dos coelhos (*Oryctolagus cuniculus*) (CHANTRY-DARMON et al., 2006). Atualmente, a maior parte dos estudos genômicos com animais envolve o melhoramento genético para a produção animal, todavia pesquisas farmacogenéticas estão sendo desenvolvidas, principalmente para espécies criadas para companhia, como os cães (FLEISCHER et al., 2008; COUTINHO & ROSÁRIO, 2010).

2.2 Conceitos básicos aplicados à farmacogenética

A partir de dados genéticos obtidos por técnicas biomoleculares, a farmacogenética propõe avaliar a farmacocinética e a farmacodinâmica dos princípios ativos, sendo que o conteúdo genético total de um organismo é denominado de genoma (MUKHERJEE & TOPOL, 2003). Atualmente considera-se a existência de dois genomas nos eucariontes, sendo um de origem cromossomal, localizado no interior do núcleo celular, e outro mitocondrial, encontrado no citoplasma das células, geralmente em formato circular (CORREIA & CORREIA, 2007).

O material genético de um organismo é composto pela sequência de bases nitrogenadas dos nucleotídeos formadores de ADN, disposto no modelo de

dupla hélice (WATSON & CRICK, 1953). A estrutura primordial do ADN se dispõe em volta de pequenas proteínas denominadas histonas que se aglomeram em um conjunto de oito unidades e originam o nucleossoma. Por meio dessa organização o ADN se dispõe no interior do núcleo e a compactação máxima em espiral de seus filamentos origina o cromossomo (Figura 1) (VIDEIRA, 2001).

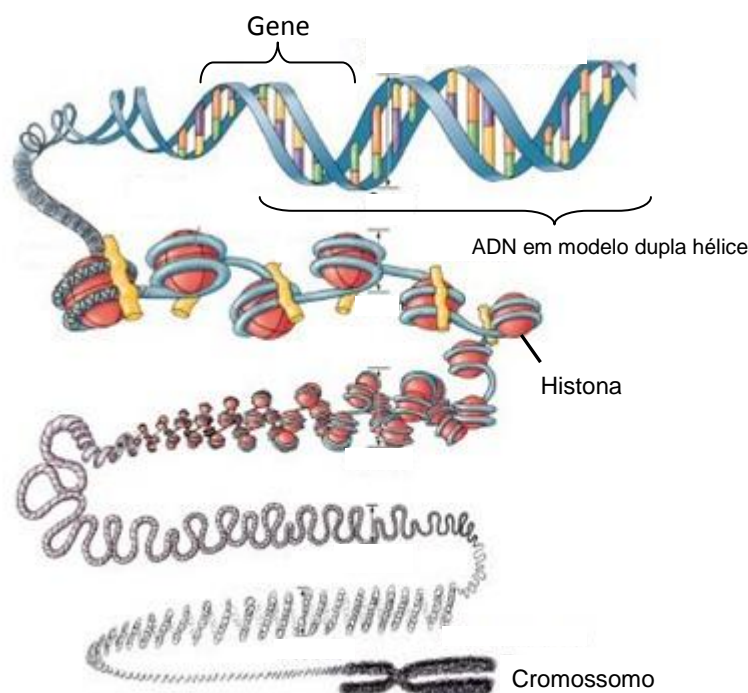


FIGURA 1 – Gene em segmento de ADN no modelo de dupla hélice compondo a estrutura cromossomal (Adaptado de LYNCH & WALSH, 1998)

Formadores da fita de ADN, os nucleotídeos são compostos por uma base nitrogenada, um fosfato e uma pentose do tipo desoxirribose. No total, a molécula de ADN é formada por quatro bases nitrogenadas, sendo duas púricas, adenina e guanina, que se ligam às bases pirimidínicas, timina e citosina, respectivamente (LEHNINGER et al., 2002). O ácido ribonucleico (ARN) e desoxirribonucleico diferem na composição de suas pentoses, sendo que o prefixo *desoxi* do ADN indica a ausência de um átomo de oxigênio que está presente na ribose do ARN (STRYER, 1996).

Por meio de uma ligação fosfodiéster, os nucleotídeos de uma mesma fita de ADN se unem, de modo que o grupo 5'-hidroxila de uma unidade conecte-se ao grupo 3'-hidroxila do nucleotídeo seguinte (Figura 2). Essas ligações possuem a mesma orientação ao longo da cadeia, sendo que cada fita linear do ácido nucleico possui polaridade específica e distinta nas extremidades 5' e 3'. No modelo de dupla hélice as fitas de ADN são dispostas de forma antiparalela, uma vez que a direção dos nucleotídeos de uma cadeia é oposta à da outra (LEHNINGER et al., 2002).

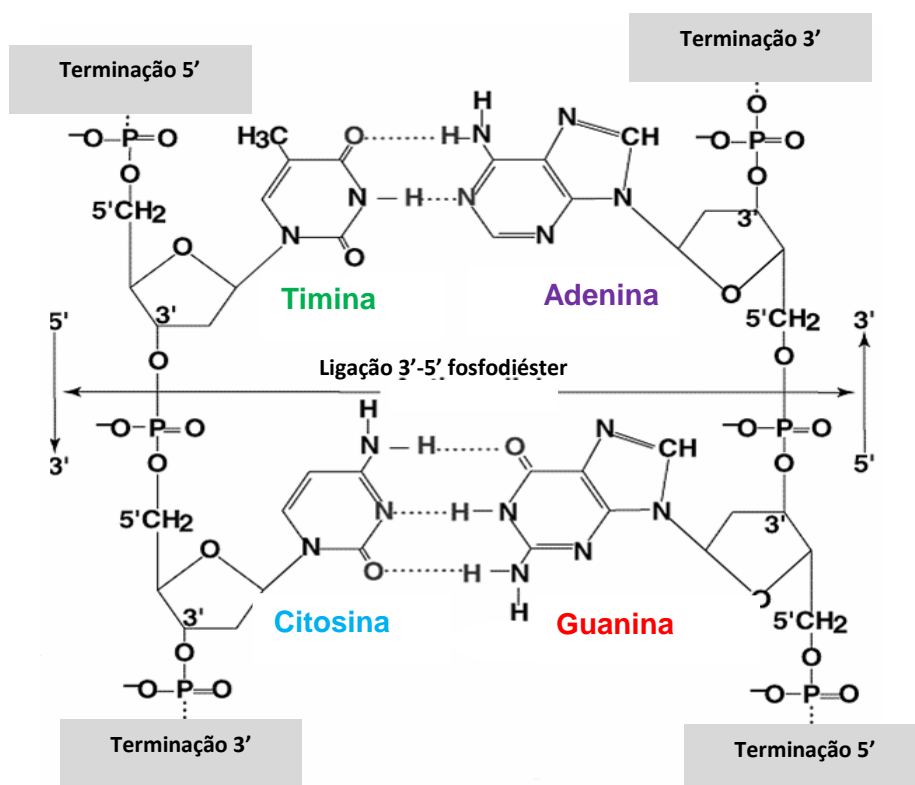


Figura 2 - Ligação 3'-5' fosfodiéster entre nucleotídeos de mesma fita de ADN e ligações de hidrogênio entre bases nitrogenadas de nucleotídeos de fitas de ADN distintas (Adaptado de CONN & STUMPF, 1980)

De acordo com o conceito molecular clássico, todo segmento de ADN responsável pela codificação de um produto funcional, representado por um polipeptídeo ou um ARN, é considerado um gene (WATSON & CRICK, 1953). De forma resumida, nos eucariontes os genes são transcritos em um ARN primário e

posteriormente processados em ARN mensageiro (ARNm), que então é traduzido em uma cadeia polipeptídica pelos ribossomos, de modo que cada grupo de três nucleotídeos representará um codón responsável pela codificação de um aminoácido (LEWIN, 2000).

Descobertas acerca das propriedades e funções gênicas iniciaram discussões em relação ao conceito mais adequado do termo gene (JOAQUIM & EL-HANI, 2010). Dentre os novos achados podem-se ressaltar a distinção entre genes estruturais e reguladores, a determinação da necessidade de ativação ou inativação gênica para o início de uma expressão genética e a compreensão de que o ADN apresenta regiões que não são transcritas em produtos, mas que se relacionam à regulação da transcrição (FOGLE, 1990; KELLER, 2002).

Atualmente sabe-se que, diferentemente dos organismos procariontes, em que praticamente todos os genes são formados por um fragmento de ADN codificador de uma proteína, os genes dos eucariontes são constituídos por dois tipos de sequências de ADN denominadas de íntrons e éxons (BERGET et al., 1977). Íntrons são partes transcritas apenas no ARN primário, que não codificam proteínas, já os éxons são definidos como a parte da sequência gênica presente no ARNm, que participa da codificação dos aminoácidos (Figura 3) (SHARP & MATASSI, 1994).

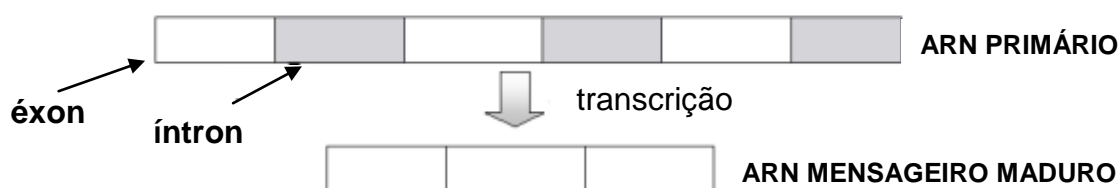


FIGURA 3 – Transcrição de um ARN mensageiro maduro a partir de éxons de um ARN primário (Adaptado de SOUTO et al., 1997)

A concepção de que genes reguladores se apresentam espalhados em vários locais dos cromossomos e constantemente distantes da sequência codificadora ou inseridos em genes estruturais, modificou a ideia de que esses elementos possuem um loco genético definido, ou seja, um local fixo no segmento

de ADN (GERSTEIN et al., 2007). Genes que ocupam o mesmo loco genético são denominados alelos e quando possuem a mesma forma e codificação são classificados como homozigotos, em contrapartida, os genes heterozigotos possuem dois modelos alélicos distintos (Figura 4) (SAXENA et al., 1996). O conjunto das informações transmitidas pelos genes no organismo constitui seu genótipo que, juntamente com o meio, determinará as propriedades fenotípicas que representam as características gerais dos indivíduos (BORÉM et al., 2003).

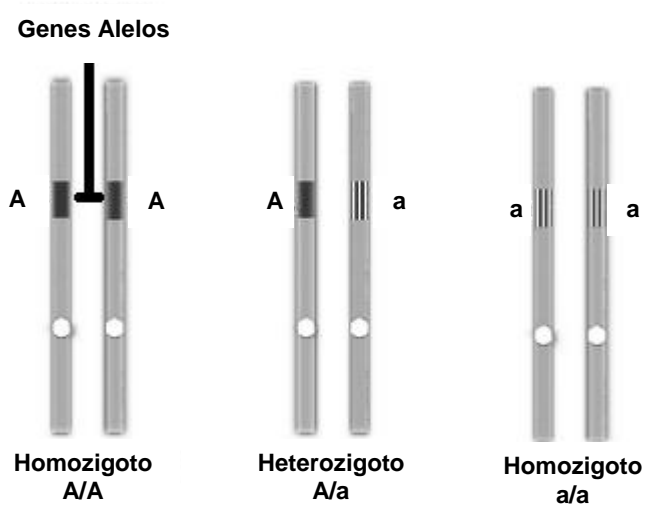


FIGURA 4 – Genes alelos ocupando o mesmo loco em cromossomos homozigotos e heterozigoto (Adaptado de <http://biologia1.blogspot.com/2008/07/gentica.html>, 2011)

2.3 Polimorfismos ligados à farmacogenética

2.3.1 Aspectos gerais dos polimorfismos genéticos

Diversidades gênicas são denominadas de mutação quando possuem taxa de incidência menor que 1%. Acima desta frequência tais diferenças genéticas são conhecidas como polimorfismos. Os polimorfismos de ADN surgem a partir de deleções, substituições e inserções de um ou mais nucleotídeos,

variações no número de cópias de sequências repetidas ou inserções de elementos genéticos móveis (EVANS & RELLING, 1999).

Há vários tipos de polimorfismo, dentre os quais os mais comumente observados são o polimorfismo de base única, conhecido por sua sigla em inglês SNP (*single nucleotide polymorphism*) e a variação no número de sequências repetidas, do inglês, *variable number of tandem repeats* (VNTR). Polimorfismos do tipo SNP são caracterizados por alterações em um único nucleotídeo que ocorrem geralmente entre duas bases púricas ou por substituição de uma base pirimidínica por outra (VIGNAL et al., 2002)

No genoma humano observa-se que as SNPs acontecem na razão de um polimorfismo a cada 800 pares de bases nitrogenadas (FONTANA et al., 2006). Além de relativamente frequentes, há evidências de que as SNPs em genes codificadores de proteínas transportadoras, enzimas que metabolizam medicamentos ou da biossíntese e reparo do ADN, poderiam modificar a eficácia dos fármacos e sua toxicidade (INGELMAN-SUNDBERG, 2001).

Em condições normais, as repetições de sequências de ADN são encontradas ao longo de todo o genoma e ocorrem num loco cromossômico específico, quando um encadeamento de nucleotídeos é repetido em série e de forma adjacente. Todavia, quando há presença de polimorfismos do tipo VNTR, esses são classificados de acordo com o tamanho de suas unidades de repetição, sendo que os mais abundantes no genoma de mamíferos são os com unidades de repetição entre uma a 13 bases nitrogenadas, denominados de microssatélites (CAVALLI-SFORZA & FELDMAN, 2003)

Os polimorfismos são utilizados como marcadores genéticos para identificar alterações ao longo da cadeia de ADN. Os diferentes tipos de marcadores polimórficos possuem uma taxa de evolução característica, de forma que os do tipo SNP são classificados como lentos e possuem a vantagem de diminuir a probabilidade de mutações recorrentes, mas se limitam a uma menor quantidade de alelos na população. Marcadores com taxas evolutivas rápidas, representados pelas VNTRs, são altamente polimórficos e mais sujeitos às mutações recorrentes, as quais podem causar interpretações errôneas das informações genéticas (JOBLING et al., 2004).

Polimorfismos que ocorrem em regiões codificadoras dos genes determinam variações na sequência de aminoácidos proteicos, que podem modificar a estrutura, propriedades físico-químicas e função da proteína responsável pelo metabolismo do fármaco ou seu sítio de ação (WEINSHILBOUM, 2003; TROTTA et al., 2004). Consequentemente, essas alterações ocasionam diminuição ou aumento da atividade da proteína codificada e do perfil metabólico dos pacientes que são classificados como metabolizadores lentos, intermediários e rápidos (Figura 5) (THORISSON & STEIN, 2003; METZGER, et al., 2006).

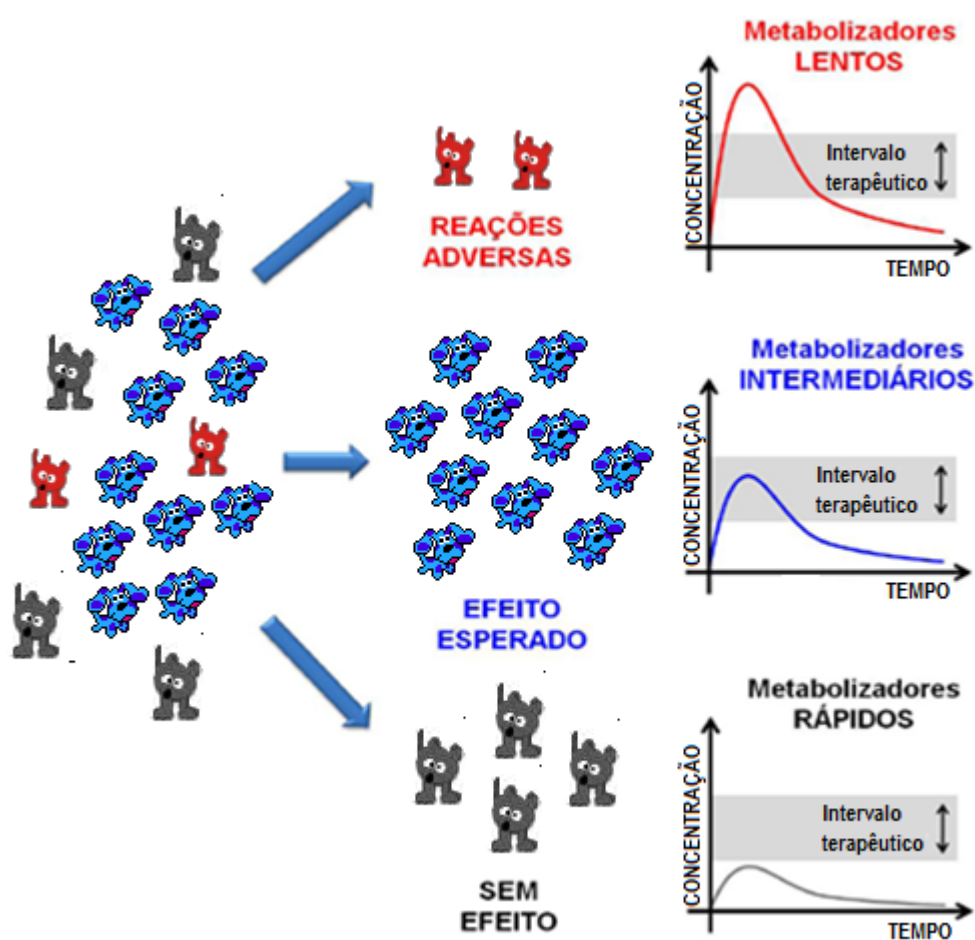


FIGURA 5 – Comparação entre indivíduos com metabolismos lento (vermelho), intermediário (azul) e rápido (cinza) em relação à eficiência e ocorrência de efeitos adversos à mesma dose de determinado fármaco (Adaptado de METZGER et al., 2006)

Organismos com metabolização lenta apresentam redução ou ausência da enzima metabolizadora, fatos que ocorrem devido à deleção do gene ou à instabilidade do ARNm, responsável pela tradução das informações do ADN durante a formação dos aminoácidos. Pacientes que apresentam metabolismo lento são mais propensos em apresentar reações adversas, toxicidade ou diminuição da eficácia com doses padrões de um determinado fármaco (NORTON, 2001).

Já os metabolizadores intermediários apresentam o padrão metabólico da maior parte da população, considerado como normal. Um aumento na produção da enzima metabolizadora associado a duplicações do gene que codifica tal enzima determinam o metabolismo rápido, no qual a dose padrão pode ser insuficiente para produzir o efeito esperado ou, se a substância ativa for o metabólito, a dose administrada poderá resultar em toxicidade, devido ao alcance rápido de concentrações elevadas do produto ativo (NORTON, 2001).

2.3.2 Farmacogenética na medicina de cães

A maior parte do conhecimento acerca da farmacogenética canina surgiu a partir de observações previamente descritas sobre variações humanas. Atualmente sabe-se que há grande semelhança entre os genomas dessas duas espécies e constatou-se que aproximadamente 360 alterações genéticas associadas a doenças em humanos também são encontradas no genoma canino (PATTERSON, 2000).

Ao contrário do que ocorre na medicina humana, há poucos trabalhos que pormenorizam variações farmacogenéticas em animais, pois a maior parte da ciência genômica relacionada à medicina veterinária enfoca características de interesse econômico, ligadas à produção animal (CAETANO, 2009). Entretanto, a tendência mundial em associar conhecimentos genéticos às aplicações terapêuticas é uma meta para as vertentes de todas as áreas da saúde e sabe-se que diferenças genotípicas entre as raças caninas podem influenciar a eficiência

terapêutica e a presença de efeitos adversos a uma determinada posologia (RODRIGUEZ, 2010).

CLUTTON-BROCK (1999) define raça como o resultado de uma escolha de características artificiais que podem não estar necessariamente relacionadas a estratégias de sobrevivência, contudo são facilitadas e estimuladas pela população humana por razões econômicas, estéticas, rituais ou porque aumentam o poder social do proprietário. Dentre os animais domésticos, algumas das maiores diversidades físicas são observadas entre as raças caninas (RODRIGUEZ, 2010).

Atualmente há mais de 400 raças de cães reconhecidas mundialmente, dentre as quais 156 se encontram registradas pelo American Kennel Club (RODRIGUEZ, 2010). Ao comparar genomas de diferentes raças caninas, LINDBLAD et al. (2005) evidenciaram que animais de diferentes grupos compartilham longos segmentos de ADN, o que permite a aplicação da mesma metodologia e de algumas informações para o estudo de várias raças, além de ser um indicativo de que esses animais possuem um ancestral em comum.

OSTRANDER & WAYNE (2005) identificaram 96 microssatélites em 85 raças caninas e observaram maior semelhança entre grupos de cães provenientes de mesma região, que possuíam morfologia semelhante e que desempenhavam atividades similares. Os autores afirmaram que provavelmente essa informação também seria aplicável em relação a variações gênicas e presumiram a divisão dos cães em quatro grandes grupos com um ancestral comum, os quais seriam raças asiáticas, de caça, pastoreio e Mastiff, sendo que algumas raças apresentaram características de mais de um grupo (Figura 6).

A maior parte das doenças hereditárias estudadas em cães é autossômica recessiva, entretanto, há enfermidades de alta incidência, como a osteoartrite, que sofrem influência genética e ambiental (PATTERSON, 2000). Adicionalmente, pode haver subgrupos pré-definidos dentro de uma mesma raça, como é o caso dos Poodles que são divididos em Poodle gigante (25 kg), miniatura (até 15 kg) e toy (até 5 kg) (EIGENMANN et al., 1984).

RODRIGUEZ (2010) demonstrou que existe equivalência de 97 a 100% no sequenciamento de ADN ao comparar cinco éxons do gene CYP2D15 de cães

domésticos com quatro espécies de canídeos brasileiros, representados pelo cachorro-do-mato, cachorro-vinagre, lobo-guará e graxaim-do-campo. Esse estudo enfatizou a aplicabilidade e a importância de estudos genômicos de cães domésticos para o maior conhecimento e preservação de espécies silvestres.

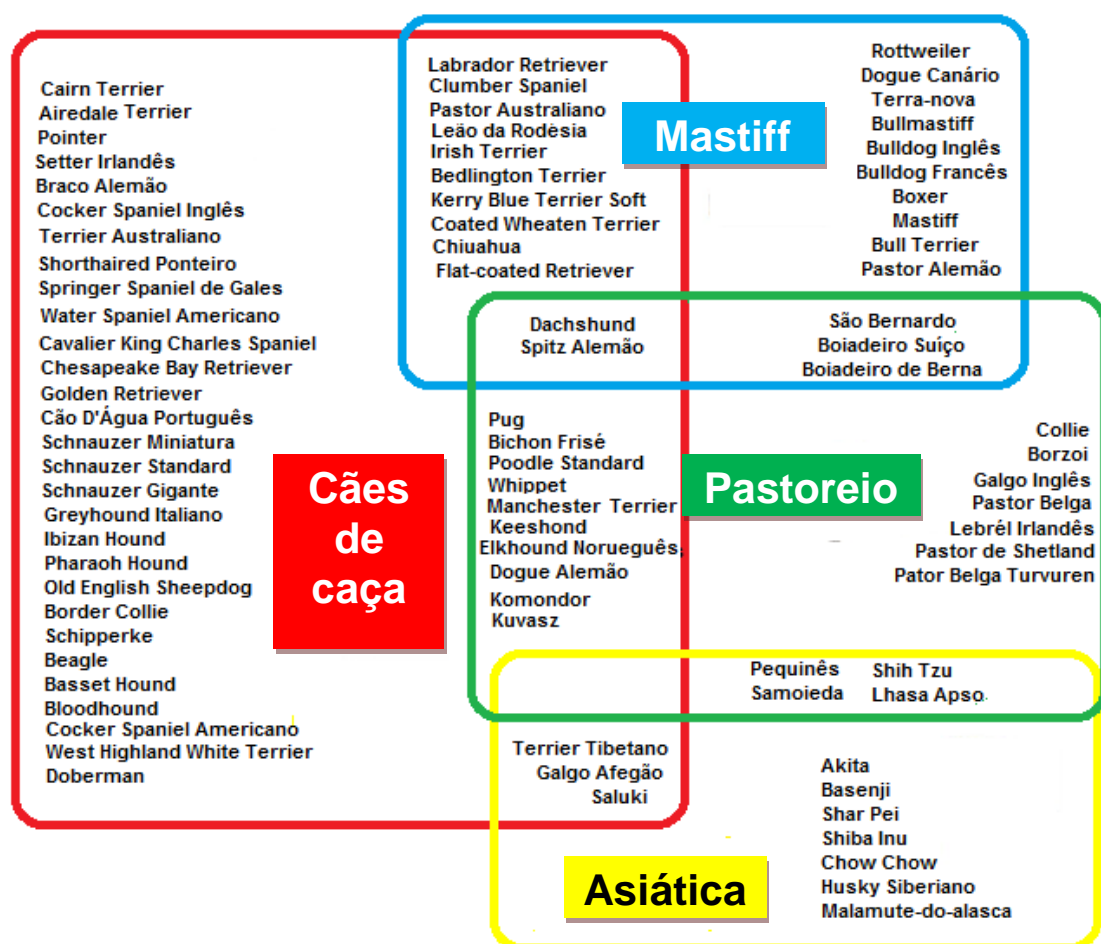


FIGURA 6 - Divisão de 85 raças caninas entre quatro grupos de acordo com perfis genéticos. Raças circundadas pela linha azul possuem características semelhantes aos Mastiffs; linha vermelha, aos cães de caça; linhas verde e amarela indicam cães com perfil pastoreio e asiático, respectivamente (Adaptado de PARKER et al., 2004)

Enquanto a maior parte das alterações metabólicas ligadas a informações genéticas humanas são atribuídas a mutações em genes particulares, nos cães a mesma variação é geralmente responsável pelo

desenvolvimento de uma enfermidade de determinada raça (SEWELL et al., 2007). Isso ocorre porque apenas de cinco a 10% da variação genética nos homens é associada a diferenças raciais, contudo, em canídeos domésticos essa relação é de 27%, sendo que pelo menos 50% das doenças hereditárias nesses animais têm forte correlação com as diferentes raças (PATTERSON, 2000; PARKER et al., 2004).

Dentre as enzimas orgânicas responsáveis pelo metabolismo dos fármacos podem-se destacar as do citocromo P450 (CYP). Tratam-se de hemoproteínas responsáveis principalmente pelo metabolismo oxidativo de substâncias endógenas e exógenas e que formam um grupo de mais de 30 famílias de enzimas relacionadas no homem. Genes codificadores dessas proteínas podem apresentar polimorfismos ou mutações genéticas com consequente variação na estrutura e função enzimáticas, além de alteração da farmacodinâmica e farmacocinética de medicamentos (CUMMINS et al., 2001).

Vários genes codificadores das isoformas do CYP450 caninas foram identificados por meio de clonagem e técnicas de sequenciamento, sendo que em alguns desses os estudos demonstraram a presença de polimorfismos genéticos (UCHIDA et al., 1990). Apesar do conhecimento remoto em relação às funções das enzimas do citocromo P450 em cães, são recentes os estudos acerca de seu envolvimento com variações genéticas e alterações no metabolismo de xenobióticos, ou seja, substâncias que não são produzidas pelo organismo (KAMIMURA, 2006).

MISE et al. (2004) em um trabalho com cães da raça Beagle, avaliaram a farmacocinética de um benzodiazepínico e determinaram a divisão dos animais em dois grupos de acordo com a velocidade de metabolização do fármaco. Os autores observaram que cães com metabolismo lento apresentaram diminuição ou ausência de uma proteína do CYP450 que reduzia consideravelmente a taxa de hidroxilação e depuração do princípio ativo do organismo e correlacionaram essa alteração com um polimorfismo no gene CYP1A2.

Adicionalmente, estudos metabólicos sobre a oxidação do anti-inflamatório celecoxibe, administrado a Beagles demonstraram sub-populações com metabolismo lento do fármaco, com meia-vida de aproximadamente cinco

horas, ou rápido, apresentando meia-vida de uma hora e meia a duas horas (PAULSON et al., 1999). Tais fatos foram relacionados a um polimorfismo genético do tipo SNP no gene CYP2D15, que também foi encontrado em cães da raça Poodle e Dachshund por RODRIGUEZ (2010).

Previamente sequenciado, o gene CYP2D15 canino ocupa o mesmo loco no cromossomo dez do CYP2D6 humano e é composto por onze éxons que possuem de 60 a 189 pares de bases e dez íntrons formados por um a 600 pares de bases. A presença de polimorfismos que causam diminuição ou ausência da enzima codificada por esse gene foi associada à redução da hidroxilação do antiarrítmico bunitrolol e do antidepressivo imipramina, com consequente atraso no metabolismo desses fármacos (TASAKI et al., 1998).

Trabalhos realizados com cães de 13 raças distintas demonstraram que o polimorfismo ligado ao gene MDR1 ocorre com maior frequência nas raças Collie (54%), Whippet de pêlo longo (41,6%) e Pastor Australiano (25,9%) (NEFF et al., 2004; GEYER et al., 2005). Este gene é responsável pela codificação da glicoproteína-P, uma molécula composta por aproximadamente 1.280 aminoácidos que funciona como uma via ativa de efluxo de xenobióticos e transporta as substâncias do meio intracelular para o lúmen do intestino, capilares cerebrais, canalículo biliar ou túbulo renal (CORNWELL, 1991).

Devido à propriedade de impedir a absorção de determinados fármacos, a glicoproteína-P foi apontada como a maior responsável pela baixa biodisponibilidade dos medicamentos administrados pela via oral, ao se comparar à aplicação intravenosa (JULIANO & LING, 1976). Entretanto, ao estudarem a farmacocinética de princípios ativos que se ligavam à glicoproteína-P em cães normais e em animais com polimorfismo de deleção do gene MDR1, MEALEY et al. (2010) não observaram diferenças farmacocinéticas entre os dois grupos e sugeriram que outros fatores também influenciariam na biodisponibilidade de substâncias administradas pela via oral em cães.

Foi constatado também que de 30 a 40% dos Collies são sensíveis à neurotoxicidade causada pelo antiparasitário ivermectina, devido a um polimorfismo de deleção do gene MDR1. Esse fato ocorre porque a ausência da glicoproteína-P consequente do polimorfismo de seu gene codificador faz com

que haja maior permanência do fármaco no tecido cerebral (MEALEY et al., 2001).

MEALEY & MEURS (2008) realizaram um estudo farmacogenômico com cães de diferentes raças diagnosticados com linfoma e que seriam tratados com o antineoplásico vincristina. Este fármaco é frequentemente associado a episódios de toxicidade hematológica causada por alterações na atividade da glicoproteína-P. Os autores observaram alta correlação estatística entre a presença do polimorfismo no gene MDR1 e a ocorrência dos efeitos adversos, principalmente neutropenia e trombocitopenia.

A deficiência do gene CYP2B11, que ocupa o mesmo loco do CYP2B6 no genoma humano, foi relacionada a diminuição nos níveis de hidroxilação do propofol em Greyhounds (ZORAN et al., 1993). Raça oriunda do Reino Unido, o Bedlington Terrier possui pré-disposição para o desenvolvimento de uma variação autossômica recessiva no gene MURR-1, associada principalmente ao acúmulo de cobre devido a um defeito primário na excreção pelos hepatócitos, o que pode acarretar problemas na metabolização de fármacos no fígado (CORONADO et al., 2003; HYUN et al., 2004).

2.4 Técnicas moleculares utilizadas na farmacogenética

Para a determinação do sequenciamento genômico, qualquer célula nucleada do organismo pode ser utilizada, incluindo fragmentos de órgãos, saliva e amostras sanguíneas, desde que as amostras possuam ácidos nucleicos íntegros e livres de contaminação. Uma particularidade da utilização de sangue periférico é que se o mesmo for colhido com o anticoagulante EDTA ou citrato a amostra pode ser conservada em temperatura de quatro a 10 °C, entretanto, quando forem utilizados coágulos, esses devem ser armazenados a -20°C, antes do processamento (HIRATA et al., 2006).

2.4.1 Fase pré-analítica

Na fase pré-analítica deve-se determinar o método a ser empregado de acordo com o tipo de amostra, conhecimento prévio ou não da mutação a ser pesquisada, confiabilidade na técnica, rapidez, viabilidade econômica e tipo de ácido nucleico que será analisado (THORNTON et al., 2005). Há particularidades de técnicas de acordo com o tipo de amostra utilizada, por exemplo, no caso de fragmentos teciduais é necessário realizar a ruptura do tecido com um homogeneizador e se houver presença de ARN residual, pode-se tratar a amostra com ARNase isenta de ADNase (HIRATA et al., 2006).

O processo de extração de ADN é composto por duas etapas, sendo que a primeira consiste no rompimento das membranas celulares, com consequente exteriorização do material genético nuclear. Já na segunda fase ocorre a purificação do ADN para remover da solução outros componentes celulares como restos de membrana, proteínas ou ARN (ROMANO, 1999).

Na etapa de rompimento das membranas celulares, geralmente se utilizam detergentes, sendo o tiocianato de guanidina uma boa opção, pois possui uma propriedade adicional que impede o ADN de se ligar a outras moléculas e facilita sua separação na segunda fase do processo. Em relação à separação do ADN, essa é feita por meio da adição de substâncias alcoólicas, como o fenol, ou altas concentrações de sal, que tornam a solução heterogênea, de forma que o ADN permaneça dissolvido em apenas uma das fases. Posteriormente, realiza-se a precipitação do ADN com etanol ou isopropanol como forma de garantir a pureza do material (AZEVEDO et al., 2003).

O tratamento de amostras de ARN é semelhante ao anterior, sendo que a lise celular pode ser realizada com detergente não-iônico ou isotiocianato de guanidina associado ao fenol e posterior precipitação do ARN com um álcool. Para a purificação da amostra, técnicas de extração de ARN que empregam colunas de afinidade para este ácido nucleico e tratamento da amostra com ADNase sem ARNase fornecem um produto com alto grau de pureza (SAMBROOK & RUSSELL, 2001).

2.4.2 Técnicas analíticas

2.4.2.1 Reação em cadeia pela polimerase

Conhecida pela sigla PCR do seu nome em inglês *polymerase chain reaction*, a técnica de reação em cadeia da polimerasa é um dos métodos moleculares mais empregados na identificação de mutações e polimorfismos genéticos. É uma técnica que utiliza uma enzima ADN polimerase termoestável para a produção de várias cópias dos segmentos de ácidos nucleicos *in vitro* (MULLIS et al., 1992). Conforme diminui a frequência de alelos raros, aumentam os erros na produção das cópias pela ADN polimerase e se reduz a especificidade da PCR. Por isso, quando há pouca quantidade de mutações ou polimorfismos, deve-se realizar o sequenciamento de ADN para a confirmação dos resultados de triagem (REISS et al., 1990).

A técnica de PCR envolve três fases, na primeira ocorre uma desnaturação do fragmento de ADN com consequente separação da fita dupla, por meio do aquecimento da amostra a 96°C. Posteriormente, a amostra é resfriada à uma faixa de temperatura que varia entre 35 e 60°C, para promover o anelamento dos iniciadores, também denominado de *primers*, à fita simples de ADN molde. Na última etapa, a enzima ADN polimerase inicia a extensão da cadeia de ADN com a organização dos desoxirribonucleotídeos (dNTPs) conforme o modelo de fragmento pré-selecionado.

Alguns fatores são essenciais para a prática da técnica de PCR, como a presença de uma ADN polimerase termoestável e de um par de iniciadores que indicam o ponto de início da polimerização. Para facilitar o processo, cátions divalentes são introduzidos na solução, assim como moléculas de dNTPs com quantidades equivalentes dos quatro tipos de bases nitrogenadas. O fragmento do ADN molde pode se apresentar na forma de fita simples ou fita dupla e a solução deve ser mantida em pH próximo a 8,3 e 9 (REGITANO et al., 2007).

2.4.2.2 Polimorfismo do tamanho do fragmento de restrição

Para a genotipagem de SNPs em regiões específicas do genoma, o método mais básico é baseado no polimorfismo de comprimento dos fragmentos de restrição, conhecido pela sigla RFLP, advinda de *restriction fragment length polymorphism*, sua denominação em inglês. Nesta técnica, o fragmento composto pelo SNP de interesse é amplificado por meio da PCR, purificado e tratado com uma enzima de restrição que reconheça apenas o alelo de uma das fitas de ADN (REGITANO et al., 2007).

Tais enzimas de restrição possuem a capacidade de reconhecer sequências específicas de nucleotídeos e promovem a quebra da fita de ADN sempre que o sítio alvo está presente, gerando fragmentos de diversos tamanhos que são separados e analisados por eletroforese em gel de agarose ou acrilamida e detectados diretamente por meio de um corante fluorescente ou ainda por coloração com nitrato de prata. O limite de detecção do método de RFLP é de uma célula polimórfica entre 50 a 100 células normais (CHEN & VIOLA, 1991).

Apesar de ser um método que não exige equipamentos avançados, o RFLP possui desvantagens por se tratar de uma técnica trabalhosa, que necessita de uma enzima de restrição que diferencie os dois alelos, o que nem sempre é possível. Além disso, o RFLP não permite uma paralelização de ensaios, o que faz com que apenas um loco seja genotipado a cada prova (SAIKI et al., 1986).

2.4.2.3 Eletroforese

Outra técnica frequentemente aplicada na avaliação genômica é a eletroforese, método empregado para separar, identificar e purificar o ADN (MANIATIS et al., 1989). Este método é simples, rápido e apresenta basicamente um sistema de suporte, como o gel de agarose, um tampão no qual está imerso o gel e conectado a esses elementos, os eletrodos.

Por meio de um campo elétrico, as moléculas carregadas migram em direção ao pólo oposto com consequente separação das partículas (SAMBROOK & RUSSEL, 2002). Devido ao grupamento fosfato, os ácidos nucleicos possuem carga elétrica negativa e migram em direção ao pólo positivo, de forma que o fator que determinará a taxa de migração será a massa da molécula (WESTERMEIER, 2005). Para observar os ácidos nucleicos em gel de agarose, deve-se corá-los e submetê-los a luz ultravioleta, sendo que o corante mais comumente utilizado é o brometo de etídeo, que se intercala entre as bases do ADN (AUSUBEL, 1994).

Nos últimos anos, a técnica de eletroforese evoluiu para o sistema de eletroforese capilar que possui vantagens em relação ao método anterior, principalmente em relação à análise simultânea de amostras. Atualmente há aparelhos que possuem até 384 capilares, o que possibilita a maximização do tempo necessário para as mais diferentes análises (REGITANO et al., 2007)

A técnica de eletroforese capilar consiste na separação das partículas em tubos de dimensões variadas, preenchidos com um eletrólito. Neste método, uma fonte de alta tensão é aplicada em eletrodos situados nos reservatórios de uma solução eletrolítica apropriada, nos quais as extremidades do capilar são imersas. Por métodos eletrocinéticos, as amostras são introduzidas no capilar, de forma que uma diferença de potencial é estabelecida entre o capilar e o recipiente que contém a amostra durante um tempo pré-determinado e para realizar a leitura, o detector é posicionado próximo ao reservatório de saída (REGITANO et al., 2007)

2.4.2.4 Método didesoxi

Em relação às técnicas de sequenciamento de ADN, a mais utilizada é o método didesoxi ou terminação da cadeia, a qual se baseia na incorporação de dNTPs e didesoxinucleotídeos (ddNTPs) a uma cadeia de ADN em crescimento, a partir de um molde do ADN de interesse. A extensão da cadeia de ADN é interrompida quando os ddNTPs são adicionados, uma vez que esses não

possuem na região terminal um grupo 3'-hidroxila (STERKY & LUNDEBERG, 2000).

O método didesoxi pode ser sequenciado de forma manual ou automatizada. Na primeira, são preparados quatro tubos de reação contendo o ADN molde, a ADN polimerase e um iniciador. Cada tubo recebe vários comprimentos aleatórios da cadeia de ADN e uma pequena quantidade de um dNTP junto com um dos ddNTPs, marcados com fósforo radioativo que irão ocasionar o término do crescimento da cadeia. As amostras são submetidas à eletroforese e posterior exposição em filme de raios X, para que a posição das bases correspondentes possa ser determinada e lida manualmente ao longo das quatro colunas do gel (REGITANO et al., 2007).

No sequenciamento automático se utilizam sequenciadores com eletroforese vertical em placa ou eletroforese em capilar, nas quais cada ddNTP possui marcação fluorescente. A geração de fragmentos é igual ao método anterior, no qual dNTPs são adicionados à nova fita e no momento da adição de um ddNTP, a extensão da cadeia é interrompida e, assim, marcada com o último didesoxinucleotídeo incorporado. No final de vários ciclos se obtêm várias cadeias de ADN com tamanhos distintos e terminadas com diferentes ddNTPs que, posteriormente, serão identificados por meio de leitura com sequenciador automático (REGITANO et al., 2007).

2.5 A ética na farmacogenética

Princípios da ética científica argumentam que, apesar do progresso no conhecimento e na tecnologia ligados à genética, os fenômenos de ativação ou inativação de genes ainda não estão totalmente compreendidos (ZINGG & JONES, 1997). Apesar de toda notoriedade e expectativa, a evolução da farmacogenética e farmacogenômica, assim como outros avanços em medicina, está imersa em questionamentos éticos, principalmente nos países em desenvolvimento (AZEVEDO, 2004).

Tais críticas procedem do fato de que informação genética codificadora de determinada proteína ou enzima em níveis ideais para a ação de um fármaco pode não ser constatada por motivos externos. Dentre tais fatores pode-se destacar a qualidade e a quantidade de alimentos, que variam de acordo com particularidades culturais, sociais e étnicas (EVANS & MCLEOD, 2003).

Além disso, sabe-se que um dos principais fatores relacionados a diferenças genéticas é a diversidade de etnias e, no caso dos animais, de raças. Portanto, é provável que a elaboração da medicação personalizada acentue a desigualdade e divisões da população mundial (AZEVEDO, 2004). Outro ponto preocupante é em relação ao custo dos mapeamentos genéticos, à capacitação dos profissionais atuais para prescrever os novos medicamentos e a necessidade do aconselhamento farmacogenômico na prática médica (FREUND & WILFOND, 2002).

Em analogia à atual realidade de fármacos cujas pesquisas não são impulsionadas por tratarem de enfermidades de baixa frequência entre a população, poderão existir grupos genéticos raros que, apesar de possuírem capacidade de metabolizar certos medicamentos, não representem uma parcela economicamente viável para a elaboração de princípios ativos (AZEVEDO, 2004). Adicionalmente, permanecem incertezas acerca da precisão genética em determinar a farmacocinética e farmacodinâmica ideais para determinado fármaco (HARNELL et al., 2003).

Apesar de o emprego de estudos clínicos baseados em genótipos não ter sido oficializado na medicina, a Food and Drug Administration (FDA) aprovou a prescrição do dinitrato de isossorbida e hidralazina para o tratamento de insuficiência cardíaca congestiva, em negros. Em 1997, a FDA havia negado a autorização para a produção do medicamento após estudos clínicos relatarem baixo índice de eficiência terapêutica com seu emprego. Contudo, em 2004 novas pesquisas constataram que em pacientes negros, os quais possuem quantidades menores de ácido nítrico no organismo, a terapia medicamentosa com esse fármaco reduziu em até 43% a mortalidade advinda de ataques cardíacos (AZEVEDO, 2004).

3 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A possibilidade de se analisar um paciente geneticamente e assim prever sua resposta a um determinado fármaco proporcionará inúmeros benefícios para a medicina e a veterinária. Dentre as vantagens proporcionadas pela farmacogenética está a redução da ocorrência de eventos inesperados, como por exemplo, efeitos adversos, a identificação de novos alvos terapêuticos e a revisão e otimização de esquemas posológicos a partir da medicação personalizada.

Adicionalmente, o emprego da farmacogenética diminuirá os custos e facilitará o desenvolvimento de novos fármacos pela indústria farmacêutica, uma vez que ao selecionar pacientes com perfis genéticos mais homogêneos, menor quantidade de testes será necessária para padronizar posologias e aprovar a comercialização dos medicamentos. Além disso, há a possibilidade de reavaliar fármacos anteriormente rejeitados por meio da revisão dos perfis dos pacientes testados e a possibilidade da entrada dos mesmos no mercado para atender a grupos específicos da população.

Na medicina veterinária, a maior compreensão das diferenças genéticas entre raças caninas, por exemplo, capacitará o profissional a aplicar informações estudadas anteriormente em raças de perfil genômico próximo. Conhecimentos acerca de enfermidades e variações farmacogenéticas em animais também poderão auxiliar na interpretação de estudos com humanos e permitirão prever se há semelhança entre as características genéticas humanas e dos modelos animais.

REFERÊNCIAS

1. AMMOUN, I.; ENCINAS, T.; VEIGA-LOPEZ, A.; ROS, J. M.; CONTRERAS, I.; GONZALEZ-AÑOVER, P.; COCERO, M. J.; MCNEILLY, A. S.; GONZALEZ-BULNES, A. Effects of breed on kinetics of ovine FSH and ovarian response in superovulated sheep. **Theriogenology**, Stoneham, v. 66, n. 4, p. 896-905, 2006.
2. AUSUBEL, F. M. **Current protocols in molecular biology**. Ney York: John Wiley & Sons, 1994. 367 p.
3. AZEVÊDO, E. S. Farmacogenômica: Aspectos éticos. **Gazeta médica da Bahia**, Salvador, v. 74, n. 2, p.145-148, 2004.
4. AZEVEDO, M. O; FELIPE, M. S. S; BRÍGIDO, M. M; MARANHÃO, A. Q; DE SOUZA, M. T. **Técnicas básicas em biologia molecular**. Brasília: UnB. 2003.
5. BERGET, S. M.; MOORE, C.; SHARP, P. A. Spliced segments at the 5 terminus of adenovirus 2 late mRNA. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 74, n. 8, p. 3171–3175, 1977.
6. BISHOP, M. D.; KAPPES, S. M.; KEELE, J. W.; STONE, R. T.; SUNDEN, S. L.; HAWKINS, G. A.; TOLDO, S. S.; FRIES, R.; GROSZ, M. D.; YOO, J. A genetic linkage map for cattle. **Genetics**, Austin, v. 136, n. 2, p. 619-39, 1994.
7. BORÉM, A.; GIUDICE, M.; SEDIYAMA, T. **Melhoramento genômico**. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 2003. 224 p.
8. BOTSTEIN, D.; WHITE, R. L.; SKOLNICK, M.; DAVIS, R. W. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. **American journal of human genetics**, Chicago, v. 32, n. 3, p. 314–331, 1980.

9. BUMSTEAD, N.; PALYGA, J. A preliminary linkage map of the chicken genome. **Genomics**, San Diego, v. 13, n. 3, p. 690–697, 1992.
10. CAETANO, A. R. Marcadores SNP: conceitos básicos, aplicações no manejo e no melhoramento animal e perspectivas para o futuro. **Revista brasileira de zootecnia**, Viçosa, v. 38, n. 2, p. 64-71, 2009.
11. CAVALLI-SFORZA, L. L.; FELDMAN, M. W. The application of molecular genetic approaches to the study of human evolution. **Nature genetics**, New York, v. 33, p. 266-275, 2003.
12. CHANTRY-DARMON, C.; URIEN, C.; DE ROCHAMBEAU, H.; ALLAIN, D.; PENA, B.; HAYES, H.; GROHS, C.; CRIBIU, E. P.; DERETZ-PICOULET, S.; LARZUL, C.; SAVE, J. C. NEAU, A.; CHARDON, P.; ROGEL-GAILLARD, C. A first-generation microsatellite-based integrated genetic and cytogenetic map for the European rabbit (*Oryctolagus cuniculus*) and localization of angora and albino. **Animal genetics**, Oxford, v. 37, n. 4, p. 335–341, 2006.
13. CHEN, J.; VIOLA, M. V. A method to detect ras point mutations in small subpopulations of cells. **Analytical biochemistry**, New York, v. 195, n. 1, p. 51-56, 1991.
14. CHOWBAY, B.; HUIHUA, L.; DAVID, M.; CHEUNG, I. B.; LEE, E. J. D. Meta-analysis of the influence of MDR1 C3435T polymorphism on digoxin pharmacokinetics and MDR1 gene expression. **British journal of clinical pharmacology**, Oxford, v. 60, n. 2, p. 159–171, 2005.
15. CLUTTON-BROCK, J. **A natural history of domesticated mammals**. 2.ed. Cambridge: University Press, 1999. 238 p.
16. CORNWELL, M. M. Molecular biology of P-glycoprotein. **Cancer Treatment and Research**, New York, v. 57, n. 1, p. 37–56, 1991.

17. CORONADO, V. A.; DAMARAJU, D.; KOHIJOKI, R.; COX, D. W. New haplotypes in the Bedlington terrier indicate complexity in copper toxicosis. **Mammalian Genome**, Chennai, v. 14, n. 7, p. 483-491, 2003.
18. CORREIA, J. H. R. D.; CORREIA, A. A. D. Alguns aspectos funcionais do epigenoma, genoma e transcriptoma nos animais. **Revista electrónica de Veterinaria**, Andalucía, v. 8, n. 10, p. 1-22, 2007.
19. COUTINHO, L. L.; ROSÁRIO, M. F. Biotecnologia animal. **Estudos avançados**, São Paulo, v. 24, n. 70, p. 123-147, 2010.
20. CRAWFORD, A. M.; DODDS, K. G.; EDE, A. J.; PIERSON, C. A.; MONTGOMERY, G. W.; GARMONSWAY, H. G.; BEATTIE, A. E.; DAVIES, K.; MADDOX, J. F.; KAPPES, S. W.; STONE, R. T.; NGUYEN, T. C.; PENTY, J. M.; LORD, E. A.; BROOM, J. E.; BUITKAMP, J.; SCHWAIGER, W.; EPPLEN, J. T.; MATTHEW, P.; MATTHEWS, M. E.; HULME, D. J.; BEH, K. J.; MCGRAW, R. A.; BEATTIE, C. W. An autosomal genetic linkage map of the sheep genome. **Genetics**, Austin, v. 140, n. 2, p. 703–724, 1995.
21. CUMMINS, C. L.; MANGRAVITE, L. M.; BENET, L. Z. Characterizing the expression of CYP3A4 and efflux transporters (P-gp, MRP1, and MRP2) in CYP3A4-transfected Caco-2 cells after induction with sodium butyrate and the phorbol ester 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate. **Pharmaceutical research**, New York, v. 18, n. 8, p. 1102–1109, 2001.
22. DESTENAVES, B.; THOMAS, F. New advances in pharmacogenomics. **Current opinion in chemical biology**, London, v. 4, n. 4, p. 440-444, 2000.
23. EIGENMANN, J. E.; PATTERSON, D. F.; ZAPF, J.; FROESCH, E. R. Insulin-like growth factor I in the dog: a study in different dog breeds and in dogs with

growth hormone elevation. **Acta endocrinologica**, Copenhagen, v. 105, n. 3, p. 294-301, 1984.

24. EVANS, E. E.; MCLEOD, H. L. Pharmacogenomics – Drug disposition, drug targets, and side effects. **The new england journal of medicine**, Waltham, v. 348, n. 6, p. 538-549, 2003.

25. EVANS, W. E.; RELLING, M. V. Pharmacogenomics: translating functional genomics into rational therapeutics. **Science**, Washington, v. 286, n. 5439, p. 487-91, 1999.

26. FLEISCHER, S.; SHARKEY, M.; MEALEY, K.; OSTRANDER, E. A.; MARTINEZ, A. Pharmacogenetic and metabolic differences between dog breeds: their impact on canine medicine and the use of the dog as a preclinical animal model. **The american association of pharmaceutical scientists journal**, Arlington, v. 10, n. 1, p. 110-119, 2008.

27. FOGLE, T. Are genes units of inheritance? **Biology & philosophy**, Dordrecht, v. 5, n. 3, p. 349-371, 1990.

28. FONTANA, V.; PUHL, A. C.; PEDRINI, F.; FALKENBERG, M.; COFRE, J. O. conceito de gene está em crise. A farmacogenética e a farmacogenômica também? **Biotemas**, Florianópolis, v. 19, n. 3, p. 87-96, 2006.

29. FREUND, C. L.; WILFOND, B. S. Emerging ethical issues in pharmacogenomics: from research to clinical practice. **American journal of pharmacogenomics**, Auckland, v. 2, n. 4, p. 273-281, 2002.

30. GARROD, A. E. **Inborn errors of metabolism**. London: Oxford University Press, 1909. 207 p.

31. GERSTEIN, M. B.; BRUCE, C.; ROZOWSKY, J. S.; ZHENG, D.; DU, J.; KORBEL, J. O.; EMANUELSSON, O.; ZHANG, Z. D.; WEISSMAN, S.; SNYDER,

M. What is a gene, post-encode? History and updated definition. **Genome research**, Cold Spring Harbor, v. 17, n. 6, p. 669-681, 2007.

32. GEYER, J.; DORING, B.; GODOY, J. R.; MORITZ, A.; PETZINGER, E. 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**, London, v. 28, n. 1, p. 95–99, 2005.

33. GUSELLA, J. F.; WEXLER, N. S.; CONNEALLY, P. M.; NAYLOR, S. L.; ANDERSON, M. A.; TANZI, R. E.; WATKINS, P. C.; OTTINA, K.; WALLACE, M. R.; SAKAGUCHI, A. Y.; YOUNG, A. B.; SHOULSON, I.; BONILLA, E.; MARTIN, J. B. A polymorphic DNA marker genetically linked to Huntington's disease. **Nature**, London, v. 306, n. 5940, p. 234 – 238, 1983.

34. HARNELL, N. R.; WILSON, J. P.; PATEL, N. C.; CRISMON, M. L. Adverse event reporting with selective serotonin-reuptake inhibitors. **Annals of pharmacotherapy**, Cincinnati, v. 37, n. 10, p. 1387-1391, 2003.

35. HIRATA, M. H.; TAVARES, V.; HIRATA, R. D. C. Da biologia molecular à medicina: métodos comumente utilizados em farmacogenética. **Revista de medicina**, Ribeirão Preto, v. 39, n. 4, p. 522-534, 2006.

36. HYUN, C.; LAVULO, L. T.; FILIPPICH, L. J. Evaluation of haplotypes associated with copper toxicosis in Bedlington Terriers in Australia. **American journal of veterinary research**, Chicago, v. 65, n. 11, p. 1573–1579, 2004.

37. INGELMAN-SUNDBERG, M. Pharmacogenetics: an opportunity for a safer and more efficient pharmacotherapy. **Journal of internal medicine**, Oxford, v. 250, n. 3, p. 186–200, 2001.

38. JAIN, K. K. Role of pharmacoproteomics in the development of personalized medicine. **Pharmacogenetics**, Bethesda, v. 5, n. 3, p. 331-336, 2004.
39. JOAQUIM, L. M.; EL-HANI, C. N. A genética em transformação: crise e revisão do conceito de gene. **Scientia e studia**, São Paulo, v. 8, n. 1, p. 93-128, 2010.
40. JOBLING, M. A. HURLES, M.; TYLER-SMITH, C. **Human evolutionary genetics: Origins, peoples and disease**. New York: Garland Science, 2004. 458 p.
41. JULIANO, R. L.; LINGB, V. A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants. **Biochimica et biophysica acta biomembranes**, Amsterdam, v. 455, n. 1, p. 152-162, 1976.
42. KAMIMURA, H. Genetic polymorphism of cytochrome P450s in beagles: possible influence of CYP1A2 deficiency on toxicological evaluations. **Archives of toxicology**, New York, v. 80, n. 11, p. 732–738, 2006.
43. KELLER, E. F. **O século do gene**. Belo Horizonte: Crisálida, 2002. 206 p.
44. LEHNINGER, A.; NELSON, D. L.; COX, M. M. **Lehninger: Princípios de bioquímica**. 3.ed. São Paulo: Sarvier, 2002. 975 p.
45. LEWIN, B. **Genes VII**. New York: Oxford University Press, 2000. 990 p.
46. LINDBLAD, K.; WADE, M. C.; MIKKELSEN, S. T.; KARLSSON, K. E.; JAFFE, B. D.; KAMAL, M.; CLAMP, M.; CHANG, J. L.; KULBOKAS, E. J .; ZODY, M. C.; MAUCELI, E.; XIE, X.; BREEN, M.; WAYNE, R. K.; OSTRANDER, E. A.; PONTING, C. P.; GALIBERT, F.; SMITH, D. R.; DEJONG, P. J.; KIRKNESS, E. Genome sequence, comparative analysis and haplotype structure of the domestic dog. **Nature**, London, v. 438, n. 7069, p. 803-819, 2005.

47. MANIATIS T.; FRISCH E. F.; SAMBROOCK J. **Molecular cloning: a laboratory manual**. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1989. 1659 p.
48. MEALEY, D.; WAITING, D. L.; RAUNIG, K. R.; SCHMIDT, F. R.; NELSON, K. L. Oral bioavailability of P-glycoprotein substrate drugs do not differ between ABCB1-1D and ABCB1 wild type dogs. **Journal of veterinary pharmacology and therapeutics**, Oxford, v. 33, n. 5, p. 453–460, 2010.
49. MEALEY, K. L.; BENTJEN, S. A.; GAY, J. M.; CANTOR, G. H. Ivermectin sensitivity in Collies is associated with a deletion mutation of the *mdr1* gene. **Pharmacogenetics**, Bethesda, v. 11, n. 8, p. 727-733, 2001.
50. MEALEY, K. L.; MEURS, K. M. Breed distribution of the ABCB1-1D (multidrug sensitivity) polymorphism among dogs undergoing ABCB1 genotyping. **Journal of the american veterinary medical association**, Schaumburg, v. 233, n. 6, p. 921-924, 2008.
51. METZGER, I. F.; SOUZA-COSTA, D. C.; TANUS-SANTOS, J. E. Farmacogenética: princípios, aplicações e perspectivas. **Revista de medicina**, Ribeirão Preto, v. 39, n. 4, p. 515 -521, 2006.
52. MISE, M.; YADERA, S.; MATSUDA, M.; HASHIZUME, T.; MATSUMOTO, S.; TERAUCHI, Y.; FUJII, T. Polymorphic expression of CYP1A2 leading to interindividual variability in metabolism of a novel benzodiazepine receptor partial inverse agonist in dogs. **Drug metabolism and disposition**, Baltimore, v. 32, n. 2, p. 240–245, 2004.
53. MOTULSKY, A. G. Drug reaction, enzymes and biochemical genetics. **Journal of the american medical association**, Chicago, v. 165, n. 7, p. 835-837, 1957.

54. MUKHERJEE, D.; TOPOL, E. J. Pharmacogenomics in cardiovascular diseases. **Current problems in cardiology**, Chicago, v. 28, n. 5, p. 317–347, 2003.
55. MULLIS, K.; FALOONA, F.; SCHARF, S.; SAIKI, R.; HORN, G.; ERLICH, H. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. **Biotechnology**, Frankfurt, v. 24, n. 1, p. 17-27, 1992.
56. NEFF, M. W.; ROBERTSON, K. R.; WONG, A. K.; SAFRA, N.; BROMAN, K. W.; SLATKIN, M.; MEALEY, K. L.; PEDERSEN, N. C. Breed distribution and history of canine *mdr1-1D*, 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, v. 101, n. 32, p. 11725–11730, 2004.
57. NORTON, R. M. Clinical Pharmacogenomics: applications in pharmaceutical R & D. **Drug discovery today**, Kidlington, v. 6, n. 4, p. 180-185, 2001.
58. OPDYCKE, J. C.; MENZER, R. E. Pharmacokinetics of diflubenzuron in two types of chickens. **Journal of toxicology and environmental health**, Washington, v. 13, n. 4, p. 721-733, 1984.
59. OSTRANDER, E. A.; WAYNE, R. K. The canine genome. **Genome research**, Cold Spring Harbor, v. 15, n. 12, p. 1707- 1716, 2005.
60. PARKER, H. G.; KIM, L. V.; SUTTER, N. B.; CARLSON, S.; LORENTZEN, T. D.; MALEK, T. B.; JOHNSON, G. S.; DEFRANCE, H. B.; OSTRANDER, E. A.; KRUGLYAK, L. Genetic structure of the purebred domestic dog. **Science**, Washington, v. 304, n. 5674, p. 1160-1164, 2004.
61. PARKER, H. G.; OSTRANDER, E. A. Canine genomics and genetics: running with the pack. **Plos genetics**, San Francisco, v. 1, n. 5, p. 507-511, 2005.

62. PATTERSON, D. F. Companion animal medicine in the age of medical genetics. **Journal of veterinary internal medicine**, Lawrence, v. 14, n. 1, p. 1-9, 2000.
63. PAULSON, S. K.; ENGEL, L.; REITZ, B.; BOLTEN, S.; BURTON, E. G.; MAZIASZ, T. J.; YAN, B.; SCHOENHARD, G. L. Evidence for polymorphism in the canine metabolism of the cyclooxygenase inhibitor, celecoxib. **Drug metabolism and disposition**, Baltimore, v. 27, n. 10, p. 1133–1142, 1999.
64. PESSÔA, R. F.; NÁCUL, F. E.; NOËL, F. Farmacogenética e farmacogenômica. Evidências de como a genética pode influenciar. A eficácia de fármacos e a busca por novos Alvos farmacológicos. **Infarma**, Brasília, v. 18, n. 11, p. 41-48, 2006.
65. PIRAZZOLI, A.; RECCHIA, G. Pharmacogenetics and pharmacogenomics: are they still promising? **Pharmacological research**, London, v. 49, n. 4, p. 357-361, 2004.
66. RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M.; FLOWER, R. J. **Rang & Dale Farmacologia**. Rio de Janeiro: Elsevier, 2007. 848 p.
67. REGITANO, L. C. A.; NICIURA, S. C. M.; IBELLI, A. M. G.; GOUVEIA, J. J. S. **Protocolos de biologia molecular aplicada à produção animal**. São Carlos: Embrapa, 2007. 72 p.
68. REISS, J.; KRAWCZAK, M.; SCHLOESSER, M.; WAGNER, M.; COOPER, D. N. The effect of replication errors on the mismatch analysis of PCR-amplified DNA. **Nucleic acids research**, Oxford, v. 18, n.4, p. 973-978, 1990.

69. RODRIGUEZ, M. C. **Caracterização do gene CYP2D15 em canídeos domésticos e selvagens**. 2010. 89 f. Tese (Doutorado em Ciências) - Faculdade de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba.
70. ROHRER, G. A.; ALEXANDER, L. J.; KEELE, J. W.; SMITH, T. P.; BEATTIE, C. W. A Microsatellite linkage map of the porcine genome. **Genetics**, Austin, v. 136, n. 1, p. 231–245, 1994.
71. ROMANO, E.; BRASILEIRO, A. C. M. Extração de DNA de plantas. **Biotecnologia, ciência e desenvolvimento**, Brasília, v. 2, n. 9, p. 40-43, 1999.
72. SAIKI, R. K.; BUGAWAN, T. L.; HORN, G. T.; MULLIS, K. B.; ERLICH, H. A. Analysis of enzymatically amplified beta-globin and HLA-DQ alpha DNA with allele-specific oligonucleotide probes. **Nature**, London, v.324, n.6093, p.163-166, 1986.
73. SALLOVITZ, J.; LIFSCHITZ, A.; IMPERIALE, F.; PIS, A.; VIRKEL, G.; LANUSSE, C. Breed differences on the plasma availability of moxidectin administered pour-on to calves. **The veterinary journal**, London, v. 164, n. 1, p. 47-53. 2002.
74. SAMBROOK, J.; RUSSELL, D. W. **Molecular cloning: a laboratorial manual**. 3.ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001. 2222p.
75. SAXENA, R.; BROWN, L. G.; HAWKINS, T.; ALAGAPPAN, R. K.; SKALETSKY, H.; REEVE, M. P.; REIJO, R.; ROZEN, S.; DINULOS, M. B.; DISTECHE, C. M.; PAGE, D. C. The DAZ gene cluster on the human Y chromosome arose from an autosomal gene that was transposed, repeatedly amplified and pruned. **Nature genetics**, New York, v. 14, n. 3, p. 292-299, 1996.

76. SEWELL, A. C.; HASKINS, M. E.; GIGER, U. Inherited metabolic disease in companion animals: searching for nature's mistakes. **The veterinary journal**, London, v. 174, n. 2, p. 252-259, 2007.
77. SHARP, P. M.; MATASSI, G. Codon usage and genome evolution. **Current opinion in genetics & development**, London, v. 4, n. 6, p. 851-860, 1994.
78. STERKY F, LUNDEBERG J. Sequence analysis of genes and genomes. **Journal of biotechnology**, Amsterdam, v. 76, n. 1, p. 1-31, 2000.
79. STRYER, L. **Bioquímica**. 4.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1996.1000 p.
80. SUTHERLAND, M. A.; RODRIGUEZ-ZAS, S. L.; ELLIS, M.; SALAK-JOHNSON, J. L. Breed and age affect baseline immune traits, cortisol, and performance in growing pigs. **Journal of animal science**, Champaign, v. 83, n. 9, p. 2087-2095, 2005.
81. TAKAHARA, S. Progressive oral gangrene probably due to block of catalase in the blood (acatalasemia). **Lancet**, London, v. 6, n. 2, p. 1101-1104, 1952.
82. TASAKI, T.; NAKAMURA, A.; ITOH, S.; OHASHI, K.; YAMAMOTO, Y.; MASUDA, M.; IWATA, H.; KAZUSAKA, A.; KAMATAKI, T.; FUJITA, S. J. Expression and Characterization of Dog CYP2D15 Using Baculovirus Expression System 1. **The journal of biochemistry**, Tokyo, v. 123, n. 1, p. 162-168, 1998.
83. THORISSON, G. A.; STEIN, L. D. The SNP Consortium website: past, present and future. **Nucleic acids research**, Oxford, v. 31, n. 1, p. 124-127, 2003.
84. THORNTON, M.; GLADWIN, A.; PAYNE, R.; MOORE, R.; CRESSWELL, C.; MCKECHNIE, D.; KELLY, S.; MARCH, R. Automation and validation of DNA-

banking systems. **Drug discovery today**, Kidlington, v. 10, n. 20, p. 1369-1375, 2005.

85. TROTTA, R.; DONATI, M. B.; IACOVIELLO, L. Trends in pharmacogenomics of drug acting on hypertension. **Pharmacological research**, London, v. 49, n. 4, p. 351-356, 2004.

86. UCHIDA, T.; KOMORI, M.; KITADA, M.; KAMATAKI, T. Isolation and cDNAs coding for three different forms of liver microsomal cytochrome P450 from polychlorinated biphenyl-treated beagle dogs. **Molecular pharmacology**, New York, v. 38, n. 1, p. 644–651, 1990.

87. VIDEIRA, P. A. **Engenharia genética**: Princípios e aplicações. Lisboa: Lidel, 2001. 184 p.

88. VIGNAL, A.; MILAN, D.; SANCRISTOBAL, M.; EGGEN, A. A review on SNP and other types of molecular markers and their use in animal genetics. Genetics selection evolution. **Genetics selection evolution**, Paris, v. 34, n. 3, p. 275-305, 2002.

89. VOGEL, F. Moderne probleme der humangenetik. **Ergeb inn med kinderheilkd**, Bartelheimer, v. 12, n. 2, p. 52-125, 1959.

90. VESELL, E. S. Advances in pharmacogenetics. **Progress in medical genetics**, Philadelphia, v. 9, n. 1, p. 291-267, 1973.

91. WATSON, J. D.; CRICK, F. H. C. A structure for deoxyribose nucleic acid. **Nature**, London, v. 171, n. 3, p. 737-738, 1953.

92. WEINSHILBOUM, R. M.; WANG, L. W. Pharmacogenetics and pharmacogenomics: Development, science, and translation. **Annual Review of Genomics and Human Genetics**, Palo Alto, v. 7, n. 2, p. 223-245, 2006.

93. WEINSHILBOUM, R. M. Inheritance and drug response. **The new england journal of medicine**, Waltham, v. 348, n. 6, p. 529-537, 2003.

94. WESTERMEIER, R. **Electrophoresis in practice**: a guide to methods and applications of DNA and protein separations. 4.ed. Weinheim: Wiley-VCH, 2005. 406 p.

95. ZINGG, J. M.; JONES, P. A. Genetic and epigenetic aspects of DNA methylation on genome expression, evolution, mutation and carcinogenesis. **Carcinogenesis**, Oxford, v. 18, n. 5, p. 869- 882, 1997.

96. ZORAN, D. L.; RIEDESEL, D. H.; DYER, D. C. Pharmacokinetics of propofol in mixed-breed dogs and greyhounds. **American journal of veterinary research**, Chicago, v. 54, n. 5, p. 755-760, 1993.