

UNIVERSIDADE DE LISBOA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA



UNIVERSIDADE
DE LISBOA



DETEÇÃO DA MUTAÇÃO DO GENE MDR1 EM CÃES DE RAÇAS PORTUGUESAS COM
APTIDÃO PARA O PASTOREIO

MIGUEL RAPOSO MONTEIRO PINTO

ORIENTADORA:

Doutora Berta Maria Fernandes Ferreira São
Braz

TUTOR:

Dr. Gonçalo Eduardo Vitor Vicente

2025

UNIVERSIDADE DE LISBOA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA



UNIVERSIDADE
DE LISBOA



DETEÇÃO DA MUTAÇÃO DO GENE MDR1 EM CÃES DE RAÇAS PORTUGUESAS COM
APTIDÃO PARA O PASTOREIO

MIGUEL RAPOSO MONTEIRO PINTO

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA VETERINÁRIA

JÚRI

PRESIDENTE:

Doutora Anabela de Sousa Santos Silva
Moreira

VOGAIS:

Doutora Berta Maria Fernandes Ferreira São
Braz
Doutor Victor Manuel Diogo de Oliveira Alves

ORIENTADORA:

Doutora Berta Maria Fernandes Ferreira São
Braz

TUTOR(A):

Dr. Gonçalo Eduardo Vitor Vicente

DECLARAÇÃO RELATIVA ÀS CONDIÇÕES DE REPRODUÇÃO DA DISSERTAÇÃO

Nome: Miguel Raposo Monteiro Pinto

Título da Tese ou Dissertação: Deteção da mutação do gene MDR1 em cães de raças portuguesas com aptidão para o pastoreio

Ano de conclusão (indicar o da data da realização das provas públicas): 2025

Designação do curso de
Mestrado ou de
Doutoramento: Mestrado Integrado em Medicina Veterinária

Área científica em que melhor se enquadra (assinale uma):

- Clínica Produção Animal e Segurança Alimentar
 Morfologia e Função Sanidade Animal

Declaro sobre compromisso de honra que a tese ou dissertação agora entregue corresponde à que foi aprovada pelo júri constituído pela Faculdade de Medicina Veterinária da ULISBOA.

Declaro que concedo à Faculdade de Medicina Veterinária e aos seus agentes uma licença não-exclusiva para arquivar e tornar acessível, nomeadamente através do seu repositório institucional, nas condições abaixo indicadas, a minha tese ou dissertação, no todo ou em parte, em suporte digital.

Declaro que autorizo a Faculdade de Medicina Veterinária a arquivar mais de uma cópia da tese ou dissertação e a, sem alterar o seu conteúdo, converter o documento entregue, para qualquer formato de ficheiro, meio ou suporte, para efeitos de preservação e acesso.

Retenho todos os direitos de autor relativos à tese ou dissertação, e o direito de a usar em trabalhos futuros (como artigos ou livros).

Concordo que a minha tese ou dissertação seja colocada no repositório da Faculdade de Medicina Veterinária com o seguinte estatuto (assinale um):

- Disponibilização imediata do conjunto do trabalho para acesso mundial;
- Disponibilização do conjunto do trabalho para acesso exclusivo na Faculdade de Medicina Veterinária durante o período de 6 meses, 12 meses, sendo que após o tempo assinalado autorizo o acesso mundial*;

* Indique o motivo do embargo (OBRIGATÓRIO)

Os dados resultantes deste estudo, irão ser publicados em revista científica, no formato de artigo científico.

Nos exemplares das dissertações de mestrado ou teses de doutoramento entregues para a prestação de provas na Universidade e dos quais é obrigatoriamente enviado um exemplar para depósito na Biblioteca da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa deve constar uma das seguintes declarações:

- É AUTORIZADA A REPRODUÇÃO INTEGRAL DESTA TESE/TRABALHO APENAS PARA EFEITOS DE INVESTIGAÇÃO, MEDIANTE DECLARAÇÃO ESCRITA DO INTERESSADO, QUE A TAL SE COMPROMETE.

Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa, 29 de janeiro de 2025

Assinatura: Assinado por: Miguel Raposo Monteiro Pinto
Num. de Identificação: 14264131
Data: 2025.02.14 19:22:29+00'00'



Assinado por: Berta Maria
Fernandes Ferreira São Braz
Identificação: B107339619
Data: 2025-02-15 às 19:06:54

Agradecimentos

Gostaria de começar por agradecer a todas as partes intervenientes na elaboração deste trabalho. Obrigado, Professora Berta São Braz, pelo seu trabalho enquanto orientadora, por todas as conversas de longas horas que tivemos no seu gabinete e pela ajuda na redação desta dissertação.

À Professora Eva Cunha, por me ter guiado ao longo de todo o processo laboratorial, sempre com um sorriso no rosto e com uma entrega incontestável. Obrigado por me incentivar, por me fazer ir à procura das explicações para determinados resultados e por todas as palavras de apreço.

À Andreia Grilo, por ter sido o meu suporte ao longo deste trabalho. Obrigado pela tua simpatia, pela preocupação, por todas as gargalhadas, por ouvires os meus desabafos e por estares disponível sempre que eu precisava de ajuda no laboratório.

Ao Professor Frederico Aires da Silva e ao Nuno Jordão, pela ajuda na interpretação dos resultados. À Raquel Abreu e à Isa Moutinho, pela generosidade demonstrada ao partilharem algumas dicas comigo aquando do trabalho no laboratório.

O maior agradecimento vai para a minha família. Aos meus pais, Xana e Paulo, por me apoiarem sempre em todas as decisões, por me incentivarem a não ter medo de arriscar e por terem incutido em mim o sentido da responsabilidade, do respeito e da perseverança. Obrigado, mãe, por teres estudado tantas vezes comigo quando a minha cabeça já não dava para mais. Aos meus avós, Isabel, Victor, Odete e Jorge. Obrigado pelos mimos, pelo orgulho que têm em mim e por todas as vezes em que me perguntaram “Então, já entregaste a tese?”. Obrigado a todos, espero não vos ter desiludido.

A ti, Carolina. A grande amiga que surgiu a meio do 1º ano e que se tornou no meu grande amor para o resto da vida. Foste um pilar fundamental nestes últimos 6 anos e foi tão, mas tão bom, crescer ao teu lado. Obrigado por seres a Panic do meu Pain, a vida tem mais cor contigo ao meu lado.

Um agradecimento muito grande a toda a equipa do Hospital Escolar Veterinário da Faculdade de Medicina Veterinária. Foram 6 meses de muita aprendizagem com todos vocês e agradeço por me terem dado espaço para que eu pudesse crescer enquanto Médico Veterinário. Um obrigado especial ao Dr. Gonçalo Vicente, por toda a simpatia, pela organização do meu estágio e por estar sempre disponível para o que fosse preciso.

Quero também agradecer à equipa do Queen's Veterinary School Hospital, da Universidade de Cambridge, em particular ao Dr. Nick Bexfield, por ter permitido a minha ida

para lá, e ao Dr. João Escalda, não só por ter sido o “elo de ligação”, mas por me ter feito sentir sempre em casa ao longo daqueles 3 meses. Foi muito importante ter tido contacto com outra realidade que não a de Portugal e foi, sem dúvida, uma experiência inesquecível.

Aos meus amigos Carolina, Carol, Cat, Gonçalo, Lina, Patrícia e Naná. Obrigado por tudo, desde o primeiro até ao último dia. Irei para sempre recordar as festas, os convívios, os rally-tascas, os passeios e as férias, mas também as infundáveis épocas de exames onde estávamos lá sempre uns para os outros. Rimos e chorámos juntos, como uma família.

À minha madrinha de praxe Rita, por todos os conselhos que me deu e por todos os bons momentos que passámos. Às minhas afilhadas Margarida, Patrícia e Rita, obrigado por me terem escolhido como vosso padrinho. Foi um prazer enorme ter feito esta caminhada ao vosso lado e cada uma de vocês tem um cantinho especial no meu coração.

O meu agradecimento a todos os detentores que aceitaram participar neste estudo. Um agradecimento especial à ACRA, Associação de Criadores de Rafeiro do Alentejo, por ter colaborado neste estudo, facilitando a colheita de tantas amostras da raça.

A todos os professores que contribuíram para a minha formação nesta enorme casa, o meu muito obrigado.

Ao Kenzo, o meu amor de quatro patas que me acompanha já há 13 anos. Dizem que o amor de um animal é do mais puro e verdadeiro que há e tu és a prova disso. És o irmão que eu nunca tive e estarás sempre comigo, a lembrar-me porque é que eu escolhi Medicina Veterinária.

Ao Centro de Investigação Interdisciplinar em Sanidade Animal (CIISA), agradeço o apoio prestado através da atribuição da Bolsa de Iniciação Científica para Licenciados.

Apoio Financeiro

Este estudo foi realizado com o apoio de uma Bolsa de Iniciação Científica para Licenciados (BIC), financiada pela Fundação para a Ciência e Tecnologia, I.P (FCT), através dos projetos UIDB/00276/2020 (CIISA) e LA/P/0059/2020 (AL4AnimalS).

Resumo

DETEÇÃO DA MUTAÇÃO DO GENE *MDR1* EM CÃES DE RAÇAS PORTUGUESAS COM APTIDÃO PARA O PASTOREIO

Uma deleção de 4 pares de bases no gene *MDR1*, mais recentemente referido como gene *ABCB1*, leva à formação de codões stop que fazem com que a síntese da glicoproteína-P (gp-P) termine precocemente. A gp-P é uma proteína transportadora de efluxo de grande importância, sendo expressa principalmente na barreira hematoencefálica, no fígado e nos intestinos, bem como em alguns tumores. Consequentemente, os cães portadores de pelo menos um alelo mutado, apresentam alterações no metabolismo de certos fármacos e uma maior suscetibilidade à toxicidade dos mesmos.

Esta mutação foi detetada em várias raças em diferentes países, sendo a maioria delas raças pastoras, como Collie e Pastor Australiano, mas também Whippet de pelo comprido e alguns cães de raças cruzadas. Até à data, segundo o nosso conhecimento, apenas se realizou um estudo em cães de raças pastoras portuguesas, onde se detetaram alguns genótipos heterozigóticos em cães da raça Barbado da Terceira. No entanto, ainda permanece por averiguar a presença desta mutação noutras raças pastoras portuguesas. Por esta razão, o principal objetivo deste estudo foi avaliar a presença da mutação *MDR1* em cães de raça Rafeiro do Alentejo.

As amostras de saliva para extração de DNA foram obtidas através de zaragatoas orais realizadas aos animais incluídos no estudo. O processamento da amostra incluiu a realização de PCR e sequenciação de DNA.

Para avaliar se houve evidência da ocorrência de efeitos adversos que possam ser associados à administração de substratos da gp-P, foi enviado aos detentores um questionário que visava obter informação que levasse à identificação da ocorrência da mutação.

A amostra populacional incluiu 42 cães da raça Rafeiro do Alentejo, 3 da raça Barbado da Terceira, 10 da raça Pastor Australiano, 4 da raça Pastor Alemão, 1 da raça Pastor de Shetland e 1 da raça Bobtail. Os resultados obtidos indicaram que todos os animais apresentavam genótipo *wild-type*, com exceção de um cão da raça Pastor Australiano que apresentava genótipo heterozigótico.

Os resultados obtidos neste estudo não evidenciam a presença da mutação do gene *MDR1* na raça Rafeiro do Alentejo, o que é positivo para os seus criadores, que assim podem reproduzir os animais sem restrições, mas também para os médicos veterinários que poderão utilizar com maior confiança os fármacos substratos da gp-P.

Palavras-chave: Gene *MDR1*; Gene *ABCB1*; Mutação; Portugal; Rafeiro do Alentejo.

Abstract

DETECTION OF THE MDR1 GENE MUTATION IN PORTUGUESE HERDING DOGS

A 4-base pair deletion in the ATP-binding cassette subfamily B member 1 (ABCB1) gene, also known as the multidrug resistance gene (MDR1), results in stop codons that prematurely terminate the synthesis of P-glycoprotein (gp-P), a critical efflux transporter expressed mainly in the blood-brain barrier, liver and intestines, as well as in some tumors. As a result, dogs carrying the mutation exhibit impaired drug metabolism and heightened susceptibility to drug toxicity.

This mutation has been detected in several breeds in different countries, being most of them herding breeds, like Collie and Australian Shepherd but also Longhaired Whippet and some mixed breed dogs. To our knowledge, only one study was conducted on Portuguese herding breed dogs and this study found some heterozygote genotypes in Barbado da Terceira dogs. However, there's still some information lacking regarding this mutation in other Portuguese herding breed dogs. For this reason, the main objective of this study was to assess the presence of the MDR1 mutation in Rafeiro do Alentejo.

Saliva samples for DNA extraction were obtained through oral swabs taken from the animals included in the study. Sample processing included PCR and DNA sequencing.

To assess whether there was evidence of adverse effects that could be associated with the administration of gp-P substrates, a survey was sent to the owners with the aim of obtaining information that would lead to the identification of the occurrence of the mutation.

The population sample included 42 Rafeiro do Alentejo, 3 Barbado da Terceira, 10 Australian Shepherd, 4 German Shepherd, 1 Shetland Shepherd and 1 Bobtail. The results showed that all the animals had a wild-type genotype, apart from one Australian Shepherd which had a heterozygous genotype.

The results obtained in this study do not show the presence of the MDR1 gene mutation in Rafeiro do Alentejo, which is positive for its breeders, who can then breed the animals without restrictions, but also for veterinarians who will be able to use gp-P substrate drugs with greater confidence.

Keywords: MDR1 gene; ABCB1 gene; Mutation; Portugal; Rafeiro do Alentejo.

Índice

Agradecimentos	iii
Apoio Financeiro	iv
Resumo.....	v
Abstract.....	vi
Índice de figuras.....	ix
Índice de tabelas	x
Índice de gráficos	xi
Lista de abreviaturas e símbolos	xii
I. Relatório de estágio	1
II. Detecção da mutação MDR1 em cães de raças portuguesas com aptidão para o pastoreio	6
1. Introdução	6
2. Revisão Bibliográfica	6
2.1 A origem do Rafeiro do Alentejo	6
2.1.1 Estatística em Portugal	8
2.2 Estrutura e Fisiologia da Glicoproteína-P.....	9
2.2.1 Glicoproteína-P na Barreira Hematoencefálica	11
2.2.2 Glicoproteína-P na Absorção Intestinal.....	12
2.2.3 Glicoproteína-P na Excreção Biliar	13
2.3 Mecanismos de Inibição da Glicoproteína-P.....	13
2.3.1 Deficiência Intrínseca de Glicoproteína-P	13
2.3.2 Disfunção Adquirida da Glicoproteína-P	16
2.4 Substratos da Glicoproteína-P.....	17
2.4.1 Lactonas Macrocíclicas.....	17
2.4.2 Outros Fármacos	20
2.5 Efeitos Adversos.....	22
2.5.1 Efeitos Neurológicos.....	22
2.5.2 Efeitos não Neurológicos	22
2.6 Opções terapêuticas em cães com mutação MDR1	23
3. Objetivos	24

4. Materiais e Métodos	24
4.1 Colheita de amostras.....	24
4.2 Extração e quantificação de DNA	25
4.3 PCR e eletroforese	26
4.4 Purificação e sequenciação de DNA.....	28
4.5 Questionário	29
5. Resultados	29
5.1 Caracterização da amostra populacional	29
5.2 Eletroforese	30
5.3 Sequenciação Sanger	31
5.4 Questionário	35
6. Discussão.....	36
7. Conclusão	40
8. Bibliografia.....	41
III. Anexos	46
Anexo 1. Estalão da raça Rafeiro do Alentejo.....	46
Anexo 2. Questionário (exemplo de participação com 1 cão)	49
Anexo 3. Folheto informativo enviado aos detentores	53

Índice de figuras

Figura 1. Variação do número de registos das raças portuguesas no CPC, nos últimos dez anos	9
Figura 2. Mecanismo proposto para o funcionamento das proteínas transportadoras ABC, envolvendo hidrólise de ATP	10
Figura 3. Esquema ilustrativo dos três diferentes desfechos resultantes da interação intestinal entre gp-P e CYP3A.....	12
Figura 4. Comparação das sequências de DNA de cães wild-type (linha de cima) e cães homocigóticos mutantes (linha de baixo).....	14
Figura 5. Diagrama representativo da evolução das raças pastoras da linhagem do Collie, tanto no Reino Unido, como na Austrália e América do Norte	15
Figura 6. Tampões utilizados na extração de DNA.....	25
Figura 7. NanoDrop One	26
Figura 8. Refrigeração dos produtos obtidos da extração do DNA	26
Figura 9. Supreme NZYTaQ II 2x Green Master Mix.....	27
Figura 10. Câmara de fluxo laminar.....	27
Figura 11. Termociclador.....	27
Figura 12. Eletroforese num gel de agarose a 2%.....	28
Figura 13. ChemiDoc TM XRS+	28
Figura 14. Tampões utilizados na purificação dos produtos de PCR.....	29
Figura 15. Eletroforese do primeiro conjunto de amostras.....	30
Figura 16. Eletroforese do segundo conjunto de amostras.....	30
Figura 17. Eletroforese do terceiro conjunto de amostras.....	31
Figura 18. Região de sequenciação das amostras	32
Figura 19. Imagem aproximada da zona da mutação.....	33
Figura 20. Genótipo heterocigótico.....	34
Figura 21. Eletroferograma dúbio.	34
Figura 22. Genótipo wild-type.....	34
Figura 23. Combinações possíveis de deleções de nucleótidos no gene MDR1	37

Índice de tabelas

Tabela 1. Frequência aproximada da mutação MDR1 em diferentes raças.....	16
Tabela 2. Lactonas macrocíclicas com evidência de serem substrato da gp-P em cães	18
Tabela 3. Outros fármacos com evidência de serem substratos da gp-P em cães.....	20
Tabela 4. Composição da amostra populacional em estudo.....	30

Índice de gráficos

Gráfico 1. Distribuição das horas passadas em cada serviço no HEV-FMV	1
Gráfico 2. Distribuição das horas passadas em cada serviço no QVSH	4
Gráfico 3. Frequência absoluta de respostas obtidas no questionário	35
Gráfico 4. Frequência absoluta da realização de um teste prévio para detecção da mutação MDR1	35
Gráfico 5. Frequência absoluta dos antiparasitários externos utilizados	36

Lista de abreviaturas e símbolos

ABC: *ATP-binding cassette*

ADP: Adenosina difosfato

ATP: Adenosina trifosfato

CHO: *Chinese hamster ovary cells*

DNA: Ácido desoxirribonucleico

EMA: *European Medicines Agency*

FCI: *Fédération Cynologique Internationale*

GABA: Ácido gama-aminobutírico

gp-P: Glicoproteína-P

IM: Intramuscular

IV: Intravenoso

kg: Quilograma

mg: Miligrama

NBD: *Nucleotide binding domain*

nm: Nanómetro

RNA: Ácido ribonucleico

SC: Subcutâneo

SNC: Sistema Nervoso Central

TMD: *Transmembrane domain*

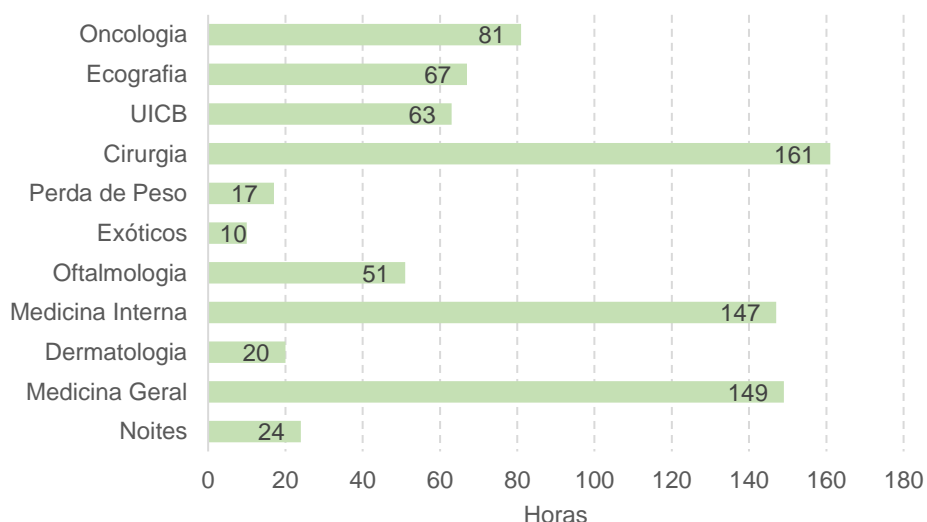
µg: Micrograma

I. Relatório de estágio

Hospital Escolar Veterinário da FMV-ULisboa

No âmbito do Mestrado Integrado em Medicina Veterinária, realizei o meu estágio curricular no Hospital Escolar Veterinário da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa (HEV-FMV), na área de animais de companhia, de 5 de setembro de 2022 a 3 de março de 2023, sob a orientação da Professora Doutora Berta São Braz e do Dr. Gonçalo Vicente. O meu horário era rotativo e permitiu-me passar pelos serviços de Oncologia, Ecografia, Unidade de Isolamento e Contenção Biológica (UICB), Cirurgia, Perda de Peso, Exóticos, Oftalmologia, Medicina Interna, Dermatologia e Medicina Geral, perfazendo um total de 790 horas. Neste valor final, estão também contemplados dois turnos noturnos de 12 horas (Gráfico 1).

Gráfico 1. Distribuição das horas passadas em cada serviço do HEV-FMV



No serviço de Oncologia, sob a coordenação do Dr. Gonçalo Vicente, assisti a consultas de referência, seguimento e eutanásia, pelo que pude observar as diferentes fases da evolução clínica de um paciente oncológico. Ajudei na realização de alguns procedimentos, tais como colheita de amostras sanguíneas, toracocenteses, punções aspirativas de agulha fina (PAAF), medições de massas e/ou linfonodos e ainda pude participar na realização de algumas quimioterapias. Pude discutir e interpretar os resultados dos exames de diagnóstico, bem como as opções terapêuticas. Nesta rotação, aprendi que o estadiamento clínico e a comunicação correta e cuidada com os detentores, são fundamentais.

No serviço de Ecografia, assisti maioritariamente a ecografias abdominais e, em menor número, a ecografias torácicas, cardíacas, oculares e cervicais. A sua realização foi sempre acompanhada de uma descrição dos achados ecográficos por parte do Dr. Rui Lemos Ferreira, Dra. Ana Isabel Filipe e Dra. Ana Margarida Lourenço, permitindo-me assim

consolidar o meu conhecimento nesta área. Após a sua realização, ajudei na redação dos respetivos relatórios, abordando assim os possíveis diagnósticos diferenciais. Nesta rotação, pude ainda observar outros procedimentos, tais como a colocação e lavagem de *Bypasses* Ureterais Subcutâneos, colocação de um cateter venoso central, cistocenteses, abdominocenteses e biópsias ecoguiadas a vários órgãos.

A rotação pela Unidade de Isolamento e Contenção Biológica (UICB) foi coordenada pela Dra. Inês Cunha Machado e pelo Dr. Miguel Maximino. A UICB possui condições próprias para receber e gerir doenças infecciosas, tais como um ambiente controlado por pressão negativa e a utilização de equipamentos de proteção individual no seu interior. Durante a minha rotação tive contacto com variadas doenças infecciosas, algumas delas zoonóticas e pude realizar exames físicos, proceder à colheita de amostras sanguíneas e de urina, colocação de cateteres intravenosos, cálculo das taxas de fluidoterapia e administração de medicamentos. Tive ainda a oportunidade de auxiliar um grupo de alunos do 3º ano, na realização do exame físico ao paciente internado.

Durante a minha passagem pela Cirurgia, contei com o auxílio de uma vasta equipa de cirurgiões: Prof. António Ferreira, Prof. Miguel Carreira, Prof.^a Lisa Mestrinho, Dra. Leonor Iglésias, Dr. Miguel Ramos, Dra. Ana Reinho, Dra. Rita Rosa, Dra. Joana Brilhante Martins e Dra. Joana Chambel Coelho. Os dias começavam sempre com a receção dos pacientes, preparação de todos os medicamentos do protocolo anestésico, administração da pré-medicação, preparação das jaulas de internamento e colocação dos cateteres intravenosos. Seguiu-se a tricotomia e a assepsia da área a intervir e posterior indução anestésica. A grande maioria dos pacientes necessitou de entubação, pelo que pude aperfeiçoar a minha técnica de realização da mesma. Já no bloco cirúrgico, se não desempenhasse a função de ajudante de cirurgião, ajudava no posicionamento do paciente e na preparação dos materiais cirúrgicos. Após a cirurgia, realizava a monitorização do paciente, garantindo que recuperava da anestesia sem complicações. As cirurgias em que pude participar incluíram a cirurgia de tecidos moles, ortopedia, laparoscopia, dentisteria e cirurgia maxilo-facial. Tive ainda a oportunidade de guiar e ajudar vários alunos de 4º ano na preparação dos pacientes para a cirurgia.

As consultas de Perda de Peso com a Dra. Mafalda Pires Gonçalves, foram maioritariamente de seguimento. Aprendi a formular uma dieta ajustada a cada animal, com base nas suas necessidades energéticas e no peso pretendido. Realizei também colheita de amostras sanguíneas e de urina, para despiste de doenças concomitantes, essencialmente metabólicas.

No serviço de Exóticos, com a Dra. Ana Reinho, pude praticar a contenção e aprender mais sobre algumas doenças de certos animais, como coelhos, petauros-do-açúcar, tartarugas, lagartos e aves.

Na Oftalmologia, sob a supervisão da Prof.^a Esmeralda Delgado e da Dra. Ana Marta Amorim, assisti tanto a consultas de primeira opinião, como de referência. Pude consolidar o meu conhecimento sobre a realização de um exame oftálmico sistemático e pude ainda acompanhar algumas cirurgias oftalmológicas e exames complementares de diagnóstico, como a eletrorretinografia.

No Serviço de Medicina Interna de Referência (SMIR), participei em consultas de referência e de seguimento de diversas áreas, tais como endocrinologia, gastroenterologia, nefrologia e afeções do trato respiratório. A equipa era constituída pelo Prof. Rodolfo Oliveira Leal, Dra. Joana Dias e Dr. Miguel Carvalho. O dia começava com rondas sobre os pacientes internados, onde discutíamos quais os passos seguintes para cada paciente. Nas consultas, tive a oportunidade de recolher a anamnese, elaborar listas de problemas e de diagnósticos diferenciais e pude ainda realizar exames físicos, medições de pressão arterial e venopunção. Pude ainda observar endoscopias digestivas altas e baixas, rinoscopias, broncoscopias, cistoscopias e vaginoscopias. Por fim, ajudei na elaboração dos relatórios para os detentores e participei na interpretação dos resultados dos exames complementares. Neste serviço também tive a oportunidade de analisar e fazer a apresentação crítica de alguns artigos no âmbito do *journal club* do serviço.

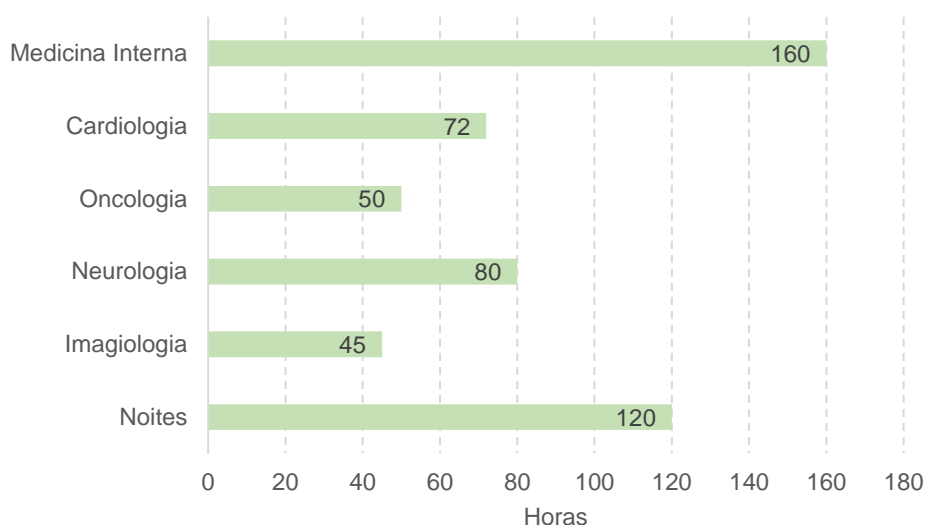
Nas consultas de Dermatologia com a Prof.^a Ana Mafalda Lourenço, à semelhança de outras rotações, participei em consultas de primeira e segunda opinião. Pude praticar a recolha da anamnese, o exame físico e a colheita de amostras por fita cola, raspagem superficial, raspagem profunda, zaragatoas auriculares e tricograma, bem como a posterior visualização microscópica e interpretação. Observei ainda algumas vídeo-otoscopias.

O meu estágio terminou na Medicina Geral, onde tive o apoio de uma vastíssima equipa. As consultas eram variadas e maioritariamente de primeira opinião. Pratiquei a recolha da anamnese, o exame físico, colheita de amostras sanguíneas e urinárias, toracocenteses, elaboração de listas de problemas e de diagnósticos diferenciais, preparação e administração de medicamentos, verificação dos calendários vacinais e interpretação de radiografias. Participei igualmente na intervenção de urgências, destacando atropelamentos, traumatismos vários e torções gástricas.

Queen's Veterinary School Hospital, University of Cambridge

De seguida, realizei um estágio extracurricular no Queen's Veterinary School Hospital (QVSH), da Universidade de Cambridge, de 27 de março a 23 de junho de 2023, sob a supervisão do Dr. Nick Bexfield. À semelhança do estágio anterior, também aqui pude rodar por vários serviços do hospital de pequenos animais: Medicina Interna, Cardiologia, Oncologia, Neurologia e Imagiologia. Realizei também duas semanas de noites, perfazendo um total de 527 horas (Gráfico 2).

Gráfico 2. Distribuição das horas passadas em cada serviço do QVSH



No serviço de Medicina Interna, os dias começavam sempre com rondas onde se reviam os casos do dia anterior e se discutiam os resultados das análises. Em certos dias, também se realizava o *journal club*. As consultas eram previamente distribuídas pelos médicos e alunos, permitindo assim uma melhor preparação e seguimento dos casos. Pude realizar a recolha de anamnese, o exame físico, a recolha de amostras e a discussão de diagnósticos diferenciais. Contei com o apoio de uma vasta equipa constituída pelo Dr. Nick Bexfield, Dra. Katie McCallum, Dra. Barbara Skelly, Dr. Andre Kortum, Dr. Armando Sánchez-Lara, Dr. Tom Butler, Dr. Oliver Russell, Dr. Arran Smith e Dra. Giulia Cattaneo. Esta rotação foi muito importante para treinar e melhorar a minha comunicação, quer com os detentores dos animais, quer com o resto da equipa.

A rotação em Cardiologia consistiu maioritariamente na observação de muitas ecocardiografias e posterior discussão de diagnósticos diferenciais e tratamentos. Observei a colocação de alguns Holter e pude aprofundar os meus conhecimentos sobre eletrocardiograma. Fui supervisionado pelo Dr. José Novo Matos, Dra. Catheryn Partington, Dr. João Escalda e Dra. Larissa Gardner.

Durante a minha passagem por Oncologia, pude acompanhar a evolução de uma grande variedade de tumores. De manhã, realizavam-se as consultas e as sessões de quimioterapia com o Dr. Pietro Loddo, Dra. Alison Hayes, Dr. Petros Odatzoglou, Dr. Ryan Soussa e Dr. Thomas Kearns. À tarde, sob a orientação da Dra. Jane Dobson e do Dr. Richard Elders, tive o privilégio de ajudar em muitas radioterapias, algo que nunca tinha observado.

As consultas de Neurologia procederam-se da mesma forma já descrita em Medicina Interna. Aqui, com o apoio do Dr. Paul Freeman, Dra. Lisa Alves, Dra. Susana Monforte, Dra.

Ana Martínez Loro e Dr. Sam Khan, aprendi a realizar um exame neurológico sistemático e a neurolocalizar as lesões. Assisti ainda a uma hemilaminectomia de urgência.

Em Imagiologia, observei e ajudei em várias radiografias, ecografias, tomografias computadorizadas e ressonâncias magnéticas. A casuística era bastante diversa e o dia começava sempre com a visualização das imagens do dia anterior, a explicação detalhada e discussão dos casos por parte da Dra. Marie-Aude Genain e Dra. Bethany Guy.

Outras Atividades

Este trabalho será apresentado num evento organizado pela ACRA, com nome ainda por definir, em fevereiro de 2025.

II. Detecção da mutação MDR1 em cães de raças portuguesas com aptidão para o pastoreio

1. Introdução

A glicoproteína-P (gp-P) é uma proteína transportadora dependente de ATP, codificada pelo gene de resistência a múltiplos fármacos *MDR1*, também referido como *ABCB1*, que transporta uma grande variedade de compostos, incluindo fármacos frequentemente utilizados na medicina veterinária, para fora da célula contra o gradiente de concentração (Nelson and Cox 2021). A influência da gp-P na farmacocinética dos fármacos foi demonstrada em cães de raça Collie e em outras raças de cães pastores, uma vez que foram relatadas intoxicações graves em resposta ao tratamento com o fármaco antiparasitário ivermectina e outras avermectinas numa subpopulação destas raças.

No início da década de 1980, foi identificada uma deleção de 4 pares de bases no gene *MDR1* canino responsável pelo fenótipo de sensibilidade à ivermectina observado em cães de raça Collie (Mealey et al. 2001), e mais tarde em muitas outras raças de cães de pastoreio (ex. Pastor Australiano, Pastor de Shetland, Bobtail, Border Collie, Pastor Inglês e Pastor Alemão) mas também em cães de raça cruzada (Neff et al. 2004). Nestas raças, os clínicos devem ter cuidado com o uso de medicamentos que contenham fármacos que sejam substratos da gp-P. No entanto, a análise genética pode revelar o genótipo *MDR1* do paciente, permitindo assim a escolha do medicamento mais adequado para aquele paciente.

Até aos dias de hoje, foi realizado apenas um estudo em raças de cães portuguesas – Cão de Serra de Aires e Barbado da Terceira – para detetar esta mutação genética, tendo sido identificados cães heterozigóticos [*MDR1* (+/-)] na segunda raça (Barroso et al. 2022). Considerando este resultado e o facto de o Rafeiro do Alentejo ser uma raça pastora com bastante representatividade em Portugal, considerou-se interessante testar animais desta raça para avaliar uma possível ocorrência da mutação.

2. Revisão Bibliográfica

2.1 A origem do Rafeiro do Alentejo

Com a implementação da agricultura e da pecuária na sociedade, o Homem encontrou no cão uma ajuda essencial não só na proteção dos rebanhos, mas também na sua condução.

Aqueles cães cuja função consiste na condução de rebanhos são designados de “cães de pastor”, enquanto o termo “cães de gado” é atribuído aos cães que possuem uma função protetora dos rebanhos contra possíveis predadores. Como exemplares portugueses de cães de pastor, consideram-se os seguintes: o Cão da Serra de Aires, o Cão de Fila de São Miguel e o Barbado da Terceira; já o Cão da Serra da Estrela, o Cão de Castro Laboreiro, o Cão de Gado Transmontano e o Rafeiro do Alentejo, são raças portuguesas de cães de gado (Cruz 2007). Para além da diferença de função, estes dois grupos distinguem-se tanto a nível

morfológico, como comportamental (Cruz 2007). Tendo em conta que este estudo incide no Rafeiro do Alentejo, é possível consultar o seu estalão no Anexo 1.

Em termos de classificação pela *Fédération Cynologique Internationale* (FCI), o Barbado da Terceira é a única raça que não é reconhecida por esta organização mundial. O Cão de Gado Transmontano é reconhecido com carácter provisório desde 2020, o que significa que não é elegível para o Certificado de Aptidão para o Campeonato Internacional FCI (CACIB), mas é elegível para os diferentes títulos da FCI. Tendo como base vários fatores, como as características morfológicas e a aptidão, a FCI distribui as raças por si reconhecidas em dez grupos. O Rafeiro do Alentejo, o Cão de Gado Transmontano, o Cão da Serra da Estrela e o Cão de Castro Laboreiro, fazem parte do grupo 2 (Pinscher e Schnauzer - Molossóides, Cães de Montanha e Boieiros Suíços), secção 2.2 (Molossóides, tipo Montanha). O Cão de Fila de São Miguel também faz parte do mesmo grupo, mas surge na secção 2.1 (Molossóides, tipo Dogue). Já o Cão de Serra de Aires surge classificado no grupo 1 (Cães de Pastor e Cães Boieiros [exceto Boieiros Suíços]), secção 1 (Cães de Pastor). Nenhuma destas raças apresenta prova de trabalho (*Fédération Cynologique Internationale* [s.d.]).

A origem dos cães de gado, dos quais o Rafeiro do Alentejo é um exemplar, é um tema discutível e para a qual são propostas duas teorias. A Teoria Tibetana defende que o Mastim Tibetano (não como é conhecido atualmente, mas sim uma raça ancestral de grandes dimensões) será a origem de todos os cães de gado, tendo sido posteriormente transportado para os países ocidentais. As diferentes raças de cães de gado europeias seriam, no fundo, "variedades" do Mastim Tibetano. No entanto, vários autores apontam que esta teoria não passa de uma mera especulação, visto que carece de dados que a suportem (Cruz 2007). Em contrapartida, a Teoria Centro-Asiática diz que o Médio Oriente terá sido um dos mais antigos centros de domesticação do cão e o mais antigo para as principais espécies de gado, baseando-se no facto de aqui terem sido encontrados vestígios arqueológicos de canídeos e ovinos domésticos desde 3685 a.C. (Cruz 2007).

O desenvolvimento da agricultura e a conseqüente expansão do seu mercado, resultou na migração dos agricultores e dos seus animais pela Europa fora, essencialmente por regiões onde hoje existem cães de gado (Cavalli-Sforza et al. 1994).

Deste modo, tomando como mais fidedigna a Teoria Centro-Asiática, percebe-se que os primeiros cães de gado terão acompanhado os agricultores nas suas migrações e ter-se-ão estabelecido em diversos países, dando origem às diferentes raças de cães de gado. A sua grande semelhança morfológica e comportamental, deve-se, não só, à partilha genética que foi ocorrendo entre os indivíduos, mas também terá sido fruto das trocas comerciais que se realizaram entre os continentes europeu e asiático (Cruz 2007).

No caso concreto do Rafeiro do Alentejo, acredita-se que acabaria por chegar às planícies alentejanas no final do século XIX, acompanhando e protegendo os rebanhos nos períodos de transumância (Alpoim 1999). As diversas condições geográficas e mudanças no clima forçavam os rebanhos a migrarem do Norte para as planícies do Sul, quando as áreas montanhosas deixavam de ser adequadas para garantir a sua subsistência (DGAV and CAP 2021). Assim, as raças ter-se-ão adaptado às diferentes condições do local onde se estabeleceram: o Cão da Serra da Estrela com pelo mais comprido, por estar numa zona mais fria, e o Rafeiro do Alentejo com pelo mais curto, dadas as altas temperaturas (Alpoim 1999). Segundo Pires et al. (2009), não existe diferenciação genética entre o Rafeiro do Alentejo e o Cão da Serra Estrela e, de acordo com a evidência histórica, o Cão da Serra da Estrela será um ancestral do Rafeiro do Alentejo (Alpoim 1999).

Na década de 1970, grandes mudanças socioeconómicas levaram os portugueses a abandonar as áreas rurais e a migrar para as cidades, causando uma drástica redução da pastorícia. Isso diminuiu a importância do Rafeiro do Alentejo, resultando na sua quase extinção no início dos anos 80. Em 1994, foi criada a ACRA - Associação de Criadores de Rafeiro do Alentejo, que teve um papel fundamental na recuperação da raça (DGAV and CAP 2021).

2.1.1 Estatística em Portugal

Em 2023, o número de registos individuais de cães em Portugal, no Clube Português de Canicultura (CPC) atingiu os 15006; destes, 2560 (17%) são indivíduos de raças portuguesas. Nos últimos dez anos, apenas em 2016 se alcançou uma percentagem mais elevada (18%).

Das dez raças mais registadas no CPC, em 2023, apenas duas são portuguesas: o Cão de Água Português, em 9º lugar com 443 registos e o Cão da Serra da Estrela em 6º lugar, com 483 registos. Considerando unicamente raças portuguesas, o Rafeiro do Alentejo surge na sexta posição, com 212 indivíduos registados. Nos últimos dez anos, o valor mais alto (238 registos) foi alcançado em 2020 e desde aí tinha vindo sempre a descer. Em 2023 voltou-se a observar um aumento, tal como demonstra a Figura 1 (CPC 2023).

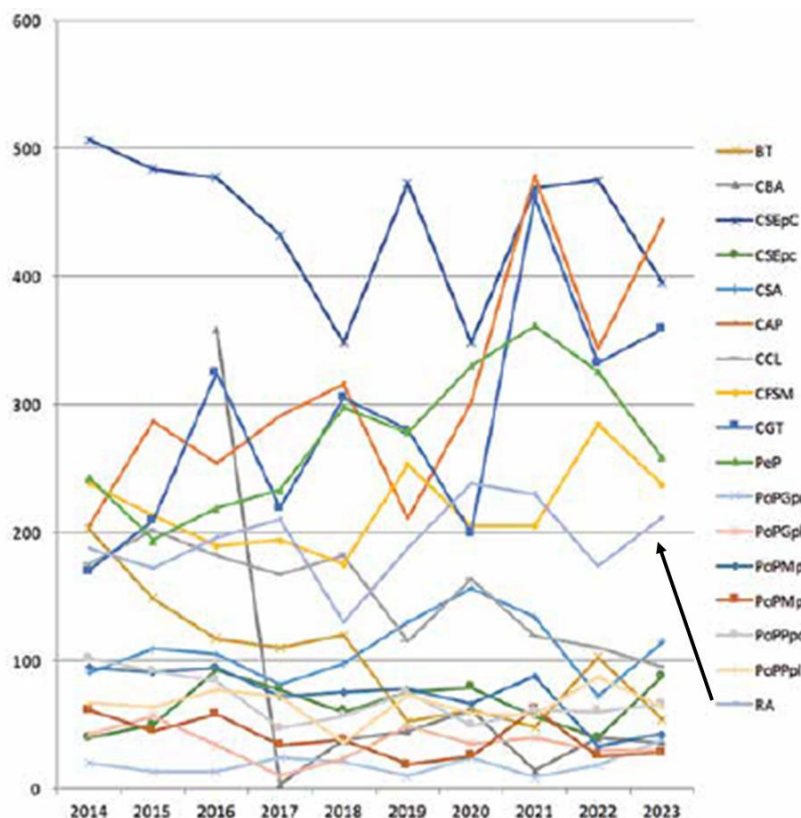


Figura 1. Variação do número de registos das raças portuguesas no CPC, nos últimos dez anos. A seta preta aponta para a linha do Rafeiro do Alentejo (RA). Fonte: CPC (2023)

2.2 Estrutura e Fisiologia da Glicoproteína-P

As proteínas transmembranares são responsáveis pela remoção de substâncias consideradas nefastas do interior da célula e por facilitar a entrada de nutrientes essenciais à mesma. As proteínas mais conhecidas pertencem a uma grande família designada por *ATP-binding cassette* (ABC). Estas proteínas transportadoras ABC são capazes de transportar aminoácidos, péptidos, proteínas, iões metálicos, lípidos, sais biliare, fármacos e outras substâncias, contra o seu gradiente de concentração (Nelson and Cox 2021).

Todas as proteínas desta família possuem dois domínios transmembranares homólogos (TMD), cada um com um domínio citoplasmático de ligação de nucleótidos (NBD). Na conformação típica destas proteínas, elas surgem viradas para o interior da célula, onde os TMD circundam uma cavidade que culmina no citoplasma e os NBD estão separados (Thonghin et al. 2018). Após a ligação do ATP à glicoproteína no citoplasma celular, o substrato também se liga à glicoproteína na extremidade citoplasmática. De seguida, ao dar-se a hidrólise do ATP em ADP, a glicoproteína sofre uma mudança na sua conformação, expondo o substrato ao espaço extracelular e diminuindo a afinidade para com este, permitindo, assim, a sua saída. Por cada molécula de substrato transportado, é necessária a hidrólise de uma molécula de ATP (Figura 2).

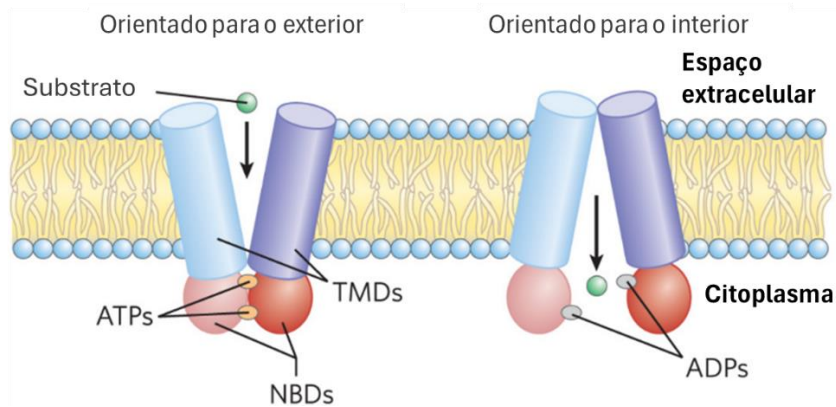


Figura 2. Mecanismo proposto para o funcionamento das proteínas transportadoras ABC, envolvendo hidrólise de ATP. Adaptado de Nelson e Cox (2021)

No entanto, foi recentemente descrita uma conformação alternativa, e mais rara, onde estas proteínas apresentam-se viradas para o exterior da célula e a já referida cavidade é reorientada para o espaço extracelular e comprimida de forma a impedir a ligação dos substratos, formando um dímero fechado com os dois NBD (Kim and Chen 2018).

Das várias proteínas pertencentes à família ABC, umas apresentam afinidade específica para determinado substrato, enquanto outras possuem um espectro mais alargado, como é o caso da *multidrug resistance P-glycoprotein 1* (MDR1), mais conhecida como glicoproteína-P, que é codificada pelo gene *ABCB1* (também conhecido como gene *MDR1*) (Nelson and Cox 2021). Esta proteína é unidirecional, na medida em que utiliza o ATP unicamente para transportar substâncias lipofílicas para fora da célula (Sisodiya et al. 2006).

Juliano e Ling (1976) realizaram um estudo onde selecionaram células CHO resistentes à colquicina e a uma grande variedade de moléculas anfipáticas, isto é, moléculas com propriedades hidrofílicas e lipofílicas. Ao perceberem que estas resistências se deviam a alterações na membrana celular, viriam a concluir que tal se devia à existência de uma glicoproteína de 170.000 daltons na superfície celular de células mutadas, atribuindo-lhe o nome de glicoproteína-P (gp-P).

Uma das características que torna esta proteína tão especial, consiste na capacidade de transporte de fármacos com estruturas variadas, sendo isto possível devido à existência de uma região de ligação (do inglês *binding pocket*) que possui vários locais de ligação sobrepostos (Aller et al. 2009). Embora não permita a ligação simultânea de vários fármacos, é capaz de permitir a ligação de moléculas das mais variadas formas, tamanhos ou cargas (Chufan et al. 2015). Por esta razão, facilmente se compreende que a gp-P possui centenas de substratos, ou seja, fármacos para com os quais possui afinidade. É também importante realçar que a composição de aminoácidos da gp-P varia de acordo com a espécie, incluindo a sequência presente na região de ligação (Aller et al. 2009), pelo que não é correto assumir que um substrato da gp-P numa determinada espécie, também o será noutra espécie.

A gp-P tem grande impacto na distribuição e excreção de fármacos, sendo expressa na superfície luminal de vários tecidos, mais concretamente nas células endoteliais dos capilares cerebrais, canalículos biliares, intestinos, células tubulares renais, testículos e placenta (Ahmed Juvale et al. 2022). Em indivíduos saudáveis, a gp-P influencia diretamente a absorção, distribuição, metabolização, excreção e, conseqüentemente, a eficácia e biodisponibilidade dos fármacos (Finch and Pillans 2014). É também expressa em determinados tumores, removendo fármacos antineoplásicos de dentro das células, impedindo a sua acumulação e diminuindo o efeito terapêutico (Nelson and Cox 2021).

No decorrer do processo de desenvolvimento de certos fármacos para medicina veterinária, algumas agências reguladoras, como a EMA, exigem que sejam feitos estudos sobre a relação do fármaco em questão com a gp-P, de forma a avaliar o índice terapêutico. Estes estudos podem ser *in vivo*, testando em animais com mutação confirmada no gene codificante da gp-P, em culturas celulares ou utilizando ratos como modelos (Mealey et al. 2023). No que diz respeito às culturas celulares, as linhas celulares mais utilizadas são uma linha celular de osteossarcoma (West and Mealey 2007) e uma linha celular renal (Mealey et al. 2017).

2.2.1 Glicoproteína-P na Barreira Hematoencefálica

A gp-P é um componente essencial da barreira hematoencefálica, sendo expressa na superfície apical das células endoteliais capilares, onde restringe a entrada de substâncias nefastas no cérebro (Ahmed Juvale et al. 2022).

Pulliam et al. (1985) descreveram pela primeira vez o fenótipo de sensibilidade à ivermectina. Neste estudo, chegaram à conclusão de que os sinais neurológicos observados em cães de raça Collie se deviam a concentrações mais elevadas de ivermectina no Sistema Nervoso Central (SNC). Anos mais tarde, Schinkel et al. (1994) usaram ratos geneticamente modificados de forma a não possuírem o gene *MDR1* e obtiveram resultados que justificavam aqueles observados em cães. Nestes ratos mutados, em comparação com ratos normais, o aumento da concentração de ivermectina no cérebro era muito maior (87 vezes mais) do que noutros tecidos (3 a 4 vezes maior).

Em cães com um funcionamento anormal da gp-P demonstrou-se que substratos como loperamida (Mealey, Greene, et al. 2008), tecnécio 99m sestamibi (Mealey, Greene, et al. 2008), acepromazina (Deshpande et al. 2016), milbemicina (Barbet et al. 2009) e ivermectina (Sherman et al. 2010), têm uma maior penetração na barreira hematoencefálica do que em cães com um normal funcionamento da gp-P.

2.2.2 Glicoproteína-P na Absorção Intestinal

A gp-P é expressa na superfície luminal do intestino delgado, limitando a absorção de determinadas substâncias do intestino para a circulação sistêmica e, como tal, tem o potencial de reduzir a biodisponibilidade (Li et al. 2024).

Ao longo dos anos tem-se estudado uma possível interação entre a gp-P humana e a subfamília 3A do citocromo P450 (CYP3A). A teoria diz que quando um fármaco administrado por via oral alcança o intestino, será absorvido passivamente por um enterócito e depois poderá ter três destinos: 1) Não é metabolizado no intestino, sendo absorvido para a corrente sanguínea, onde atingirá o fígado através da veia porta; 2) É metabolizado pelas enzimas do CYP3A e os metabolitos resultantes podem ser logo absorvidos para a corrente sanguínea ou transportados para o lúmen intestinal; 3) Não chega a sofrer metabolização na primeira passagem por um enterócito, pois é transportado de novo para o lúmen intestinal pela gp-P e este processo pode-se repetir inúmeras vezes, até que por fim seja metabolizado em algum enterócito. (Figura 3). Esta interação é vista como um mecanismo de defesa para impedir a entrada de xenobióticos na circulação sistêmica, conferindo às enzimas múltiplas oportunidades para a metabolização dos mesmos (Benet 2009).

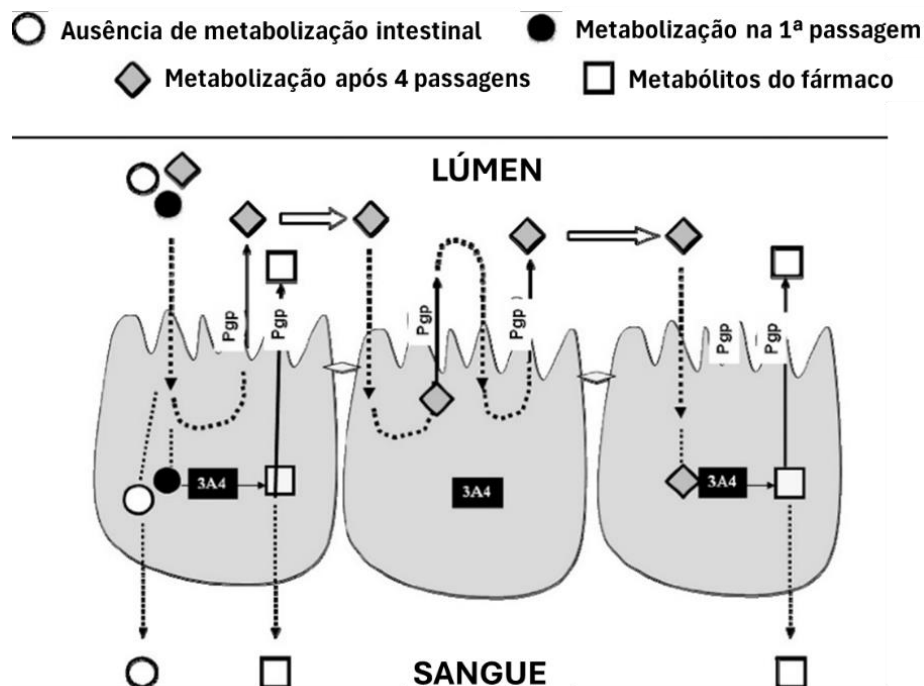


Figura 3. Esquema ilustrativo dos três diferentes desfechos resultantes da interação intestinal entre gp-P e CYP3A. Adaptado de Benet (2009)

Segundo Mealey et al. (2010), não existe diferença na biodisponibilidade após administração oral de loperamida, de ciclosporina, de quinidina e de nelfinavir entre cães com funcionamento normal e anormal da gp-P, sugerindo que a gp-P intestinal não deverá ter um impacto significativo na absorção intestinal destes fármacos. Já Myers et al. (2018) provaram que o mesmo não acontece com a fexofenadina, cuja absorção é maior em cães com uma gp-P deficiente. Ainda assim, crê-se que os estudos realizados em cães não são suficientes para aferir o impacto da gp-P na farmacocinética de fármacos administrados por via oral (Mealey et al. 2023).

2.2.3 Glicoproteína-P na Excreção Biliar

É na superfície apical dos canalículos biliares que a gp-P é expressa, participando na excreção de diversos fármacos pela via biliar (Mizoi et al. 2024).

Coelho et al. (2009) observaram que a excreção biliar de tecnécio 99m sestamibi, um radiofármaco utilizado, entre outros, como marcador de perfusão miocárdica, está significativamente diminuída em cães homozigóticos para a mutação MDR1, em comparação com os cães *wild-type*. No que diz respeito aos cães heterozigóticos, não se observou uma diferença estatisticamente significativa entre estes e os cães *wild-type*.

Considera-se que a ausência de uma correta excreção biliar mediada pela gp-P é a causa dos efeitos secundários não neurológicos observados quando um cão com a mutação recebe a dose recomendada de um substrato da gp-P para um cão normal (Mealey, Fidel, et al. 2008).

2.3 Mecanismos de Inibição da Glicoproteína-P

O deficiente funcionamento da gp-P pode ser intrínseco, através de polimorfismos genéticos, ou adquirido, se for causado por interações entre fármacos (Martinez et al. 2008).

2.3.1 Deficiência Intrínseca de Glicoproteína-P

Mealey et al. (2001) colocaram a hipótese de o fenótipo de sensibilidade à ivermectina ser causado por um polimorfismo genético e viriam a concluir que os cães de raça Collie homozigóticos mutantes apresentavam uma deleção de 4 pares de base no codão 294, que corresponde ao aminoácido 75. Por sua vez, esta mutação leva ao aparecimento de vários codões *stop* prematuros que surgem a partir do aminoácido 91 e que fazem com que menos de 10% da gp-P seja traduzida, originando um fragmento não funcional da gp-P (Figura 4).

```

275 TEGTTTTTGGAAAATGACAGATAGCTTTGCAAATGCAGGAATTTCAAGAAACAAAACCTTT 336
TEGTTTTTGGAAAATGAC-----AGCTTTGCAAATGCAGGAATTTCAAGAAACAAAACCTTT

337 CCAGTTATAATTAATGAAAGTATTACGAACAATACACAACATTTTCATCAACCATCTGGAGGA 398
CCAGTTATAATTAATGAAAGTATTACGAACAATACACAACATTTTCATCAACCATCTGGAGGA

399 GGAAATGACCACGTATGCCTATTATTACAGTGGGATCGGTGCTGGCGTGCTGGTGGCTGCTT 460
GGAAATGACCACGTATGCCTATTATTACAGTGGGATCGGTGCTGGCGTGCTGGTGGCTGCTT

461 ACATCCAGGTTTCATTCTGGTGCCTGGCAGCAGGAAGACAGATACTCAAAATTAGAAAACAA 522
ACATCCAGGTTTCATTCTGGTGCCTGGCAGCAGGAAGACAGATACTCAAAATTAGAAAACAA

523 TTTTTTCATGCTATCATGCGACAGGAGATTGGCTGGTTTGACGTGCATGACGTTGGGGAGCT 584
TTTTTTCATGCAATCATGCGACAGGAGATTGGCTGGTTTGACGTGCATGACGTTGGGGAGCT

585 TAACACCCGGCTCACAGACGATGTCTCCAAAATCAATGAAGGAATTGGCGACAAAAGTTGGAA 646
TAACACCCGGCTCACAGACGATGTCTCCAAAATCAATGAAGGAATTGGCGACAAAAGTTGGAA

647 TGTTCCTTTCAATCAATAGCAACATTTTTACCCGGTTTTATAGTGGGGGTTTACACGTGGTT 708
TGTTCCTTTCAATCAATAGCAACATTTTTACCCGGTTTTATAGTGGGGGTTTACACGTGGTT

```

Figura 4. Comparação das sequências de DNA de cães wild-type (linha de cima) e cães homozigóticos mutantes (linha de baixo). É de destacar a deleção de 4 pares de base no codão 294 do DNA mutado, bem como a presença de alguns codões stop assinalados a negrito. Fonte: Mealey et al. (2001)

Através do mapeamento genético e análises de haplótipos, Neff et al. (2004) concluíram à data que o alelo mutante estava presente em pelo menos nove raças: Pastor Australiano, Pastor Australiano Miniatura, Collie, Pastor Inglês, McNab, Bobtail, Pastor de Shetland, Whippet de pelo comprido e Silken Windhound. Estes autores defendem que estas raças portadoras da mutação MDR1 possuem um ancestral comum que terá vivido no Reino Unido, algures no século 19 (Figura 5). Antes de 1870, não existem registos de cães pastores, apenas algumas variações de cães de trabalho. Com a chegada da industrialização e das consequentes alterações socioeconómicas, muitos destes cães deixaram de ser necessários para conduzir as ovelhas até aos mercados, o que terá impulsionado a realização dos concursos caninos, onde se avaliavam a forma e as características anatómicas ao invés da sua função (Combe 1987). Este terá sido o ponto de viragem para as raças pastoras, pois terão deixado de ser apenas variações regionais e passaram a ser raças registadas. As primeiras raças a surgir foram o Collie, Bobtail e Pastor de Shetland (Combe 1987).

O Pastor de Shetland é semelhante ao Collie em tamanho, forma e comportamento, pelo que se acredita ser um descendente dos Collies primordiais, os de trabalho. Já o Bobtail, possui características muito diferentes do Collie e o mais provável é que a origem do gene mutado provenha de cruzamentos entre os ancestrais de ambas as raças (Neff et al. 2004).

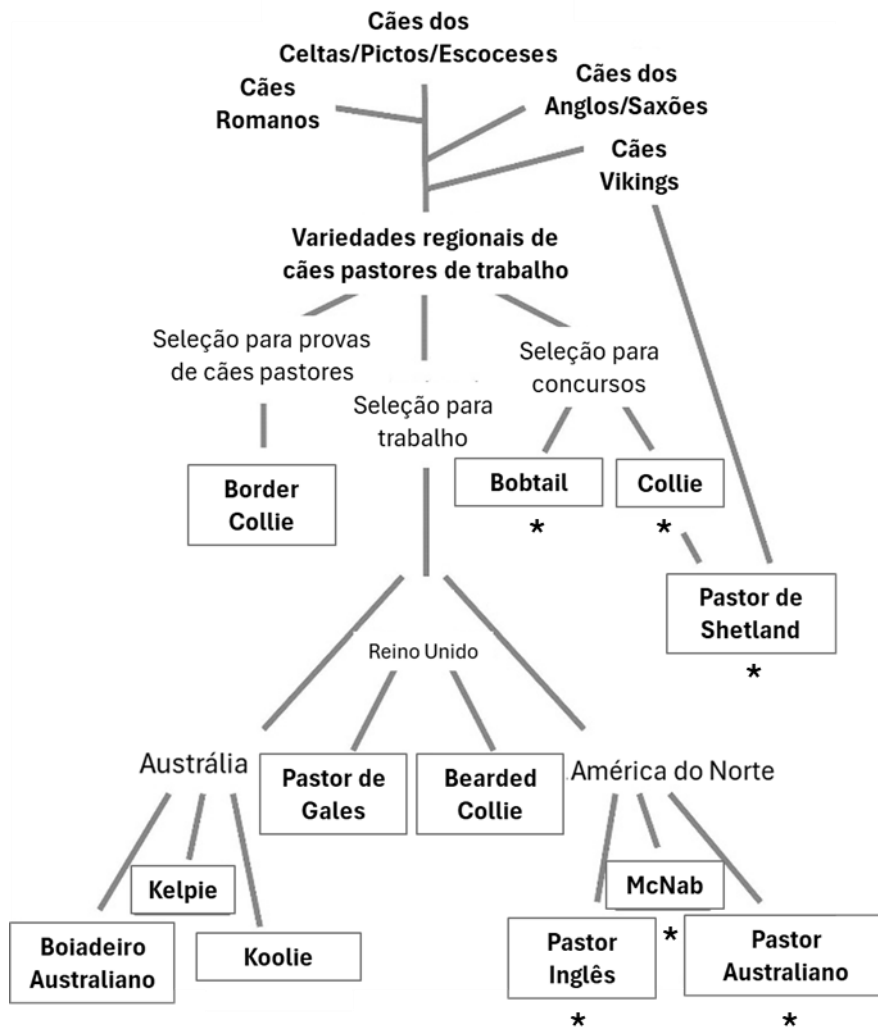


Figura 5. Diagrama representativo da evolução das raças pastoras da linhagem do Collie, tanto no Reino Unido, como na Austrália e América do Norte. As raças que à data eram portadoras da mutação, estão assinaladas com asterisco. Adaptado de Neff et al. (2004)

O Whippet de pelo comprido é descrito como uma variedade antiga que terá sido restaurada por volta de 1950, por um criador que também criava Pastores de Shetland. Esta teoria é suportada pelo facto de ambas as raças favorecerem o haplótipo II da mutação (Neff et al. 2004). Já o Silken Windhound surge mais tarde, nos anos 80, através de múltiplos cruzamentos com Borzoi, Whippet e Whippet de pelo comprido, de onde provavelmente herdaram o gene mutado, pois também esta raça favorece o haplótipo II (Neff et al. 2004).

Os dados mais recentes sobre a frequência aproximada desta mutação nas várias raças, foram disponibilizados por Mealey et al. (2023) e podem ser consultados na Tabela 1.

Tabela 1. Frequência aproximada da mutação MDR1 em diferentes raças. De acordo com Mealey et al. (2023)

Raça	Frequência aproximada
Collie	70%
Whippet de pelo longo	65%
Pastor Australiano	50%
Pastor Australiano Miniatura	50%
McNab	30%
Silken Windhound	30%
Pastor Inglês	15%
Pastor de Shetland	15%
Pastor Alemão	10%
Cruzamentos entre raças pastoras	10%
Raças cruzadas	5%
Bobtail	5%
Border Collie	<5%
Boxer	<1%
Husky Siberiano	<1%
Black Mouth Cur	8/26 testaram positivo (≈ 0.3%)
Chinook	4/13 testaram positivo (≈ 0.3%)
Carolina Dog	4/13 testaram positivo (≈ 0.3%)

2.3.2 Disfunção Adquirida da Glicoproteína-P

Há certos fármacos que podem inibir a gp-P de diversas formas, tal e qual como os antagonistas atuam em certos recetores. Isto pode acontecer através da competição com os substratos da gp-P por um local na região de ligação (Marchetti et al. 2007), através de substâncias que alterem a integridade da membrana celular lipídica ou ainda através da interrupção da hidrólise de ATP, visto que esta é essencial para o normal funcionamento da gp-P (Mealey et al. 2023). A inibição pela competição por um local de ligação é a causa mais frequente e, tal como Mealey et al. (2023) referem, quando dois substratos da gp-P são administrados concomitantemente, devemos ter em conta que um deles poderá atuar como inibidor da gp-P e, conseqüentemente, impedir a saída do outro fármaco.

O cetoconazol é um dos substratos que está mais associado a reações adversas graves quando é administrado em simultâneo com outros fármacos que sejam substratos da gp-P. Em conjunto com vimblastina, poderá causar neutropénia, sinais gastrointestinais e sepsis (Mealey and Fidel 2015). Segundo Coelho et al. (2009), o cetoconazol reduz significativamente a acumulação biliar do composto técnico 99m sestamibi, sugerindo assim que outros substratos da gp-P que tenham um processo de excreção biliar semelhante,

podem ser afetados de igual forma por este fármaco. Também se sabe que é responsável pelo aumento das concentrações plasmáticas de ciclosporina, no entanto, desconhece-se se é devido a inibição da gp-P ou do citocromo P450 (Aidasani et al. 2008).

Segundo Taskar et al. (2022), com base nas evidências até à data, existe um baixo risco de interações entre fármacos com base na inibição da gp-P a nível biliar e renal.

2.4 Substratos da Glicoproteína-P

2.4.1 Lactonas Macroclílicas

O grupo das lactonas macroclílicas engloba dois subgrupos: as avermectinas (ivermectina, doramectina, eprinomectina e selamectina) e as milbemicinas (milbemicina oxima e moxidectina). Estas substâncias são produtos da fermentação de espécies de *Streptomyces* e são moléculas lipofílicas, apresentando grande atividade nematocida, inseticida e alguma acaricida (Mealey and Clarke 2016).

O seu mecanismo de ação consiste na ligação aos recetores glutamato dos canais de cloro, presentes nas células nervosas e musculares dos invertebrados. Esta ação vai levar a uma abertura desses mesmos canais, permitindo um grande influxo de iões cloro, com hiperpolarização celular, que culmina na paralisia e morte dos parasitas. Para além disso, também possuem a capacidade de estimular a libertação do neurotransmissor GABA das terminações nervosas, potenciando a sua ligação nos recetores pós-sinápticos e inibindo a neurotransmissão. Nos mamíferos, os recetores GABA encontram-se no SNC, daí a extrema importância da barreira hematoencefálica e da gp-P (Sulik et al. 2023).

Para além da ivermectina, os cães homozigóticos para a mutação MDR1 podem apresentar hipersensibilidade a outras lactonas macroclílicas (Tabela 2).

Tabela 2. Lactonas macrocíclicas com evidência de serem substrato da gp-P em cães

Fármacos		Medicamentos disponíveis no mercado português	Forma farmacêutica de apresentação	Doses terapêuticas	Doses tóxicas em cães com mutação <i>MDR1</i>	Efeitos adversos	Referências bibliográficas
Ivermectina		Heartgard 30 Plus® (ivermectina + pamoato de pirantel)	Comprimidos mastigáveis	6 µg/kg	≤ 0.06 mg/kg – sem sinais neurológicos (a) ≥ 0.01 mg/kg – com sinais neurológicos (b)	Midríase Depressão Ataxia Tremores Hipersalivação Paresia	(a) (DGAV 2020) (b) (Boehringer Ingelheim Animal Health USA Inc. 2023)
Selamectina		Stronghold® Evicto® Selames® Selehold®	Unção punctiforme	6 mg/kg	≤ 30 mg/kg – sem sinais neurológicos (c)	Excitabilidade Estupor Coma Morte	(c) (EMA 2024)
Milbemicina Oxima	+ Praziquantel (d)	Milbemax® Milbeguard Duo® Milbactor® Milprazon® Milpro® Milbenin® Mektix® Amcofen® Alpramil®	Comprimidos	0.5 mg/kg	5 mg/kg (g)	Letargia Ataxia Tremores Midríase Hipersalivação	(d) (DGAV 2023) (e) (EMA 2024b) (f) (EMA 2024c) (g) (Drag et al. 2022)
	+ Lotilaner (e)	Credelio Plus®		0.75 - 1.53 mg/kg			

	+ Afoxolaner (f)	Nexgard Spectra®		0.5 - 1.39 mg/kg			
Moxidectina	Substância única	Guardian SR®	Injetável subcutâneo (h)	0.17 mg/kg	5x a dose recomendada – sem sinais neurológicos (h)	/	
		Afilaria®	Injetável subcutâneo	0.17 mg/kg			
			Comprimidos (i)	3 µg/kg	≤ 90 µg/kg – sem sinais neurológicos (i)		
	+ Imidacloprida	Advocate® Prinovox®	Unção punctiforme (j)	2.5 mg/kg	5x a dose recomendada – sem sinais neurológicos (j)		
		Prinocate®		1 mg/kg			
+ Sarolaner + Embonato de pirantel	Simparica Trio®	Comprimidos mastigáveis (k)	0.024 – 0.048 mg/kg	5x a dose máxima recomendada (k)	Ataxia Fasciculação		

(h) (Krautmann et al. 2019)
(i) (Paul et al. 2000)
(j) (Paul et al. 2004)
(k) (EMA 2024d)

2.4.2 Outros Fármacos

Tabela 3. Outros fármacos com evidência de serem substratos da gp-P em cães

Fármacos		Medicamentos disponíveis no mercado português	Forma farmacêutica de apresentação	Doses terapêuticas	Doses tóxicas em cães com mutação <i>MDR1</i>	Efeitos adversos	Referências bibliográficas
Emodepside	+ Praziquantel	Profender®	Comprimidos	1 mg/kg	2x a dose recomendada (a) 1,18 mg/kg (20 mg para 17 kg) (b)	Tremores Ataxia Hipersalivação	(a) (EMA 2021) (b) (Gaens, Leithäuser, et al. 2019) (c) (EMA 2021b)
	+ Toltrazuril	Procox®	Suspensão oral	0.45 mg/kg	Não recomendado, devido a baixa tolerância para o produto (c)		
Acepromazina		Calmivet®	Injetável intramuscular ou endovenoso	0.25 mg/kg – tranquilização ligeira ou pré-anestesia 0.5 mg/kg – tranquilização profunda (d)	0.04 mg/kg (e)	Sedações mais longas e profundas do que os cães heterozigóticos e os normais	(d) (DGAV 2023b) (e) (Deshpande et al. 2016)
Apomorfina		Apovomin®	Injetável subcutâneo	0.1 mg/kg (f)	0.07 mg/kg (2 mg para 30 kg) na conjuntiva (g)	Vômito mais grave, tanto em duração como em número de episódios Depressão do SNC	(f) (DGAV 2021) (g) (Campbell et al. 2017)
Vincristina			Injetável endovenoso	0.5-0.7 mg/m ²	0.5-0.7 mg/m ² (h)	Toxicidade hematológica (neutropénia, trombocitopénia)	(h) (Mealey, Fidel, et al. 2008)

Loperamida	Imodium®	Comprimidos	0.1 mg/kg (i)	0.1 mg/kg (j)	Letargia Ataxia Hipersalivação Incontinência Vocalização contínua	(i) (Papich 2018) (j) (Long et al. 2017)
Ciclosporina	Atopica® Cyclavance® Sporimune® Modulis®	Cápsulas (k) Solução oral	5 mg/kg	3.3 mg/kg (m)	Imunossupressão exagerada	(k) (DGAV 2023c) (l) (DGAV 2024) (m) (Mackin et al. 2020)
		Solução oral (l)				
Grapiprant	Galliprant®	Comprimidos	2 mg/kg (n)	2 mg/kg (o)	Vômito autolimitado	(n) (EMA 2021c) (o) (Heit et al. 2021)

(b) NOTA: É importante realçar que, para além do cão ser homozigótico para a mutação MDR1, também não se respeitou o jejum recomendado para a administração deste medicamento.

2.5 Efeitos Adversos

2.5.1 Efeitos Neurológicos

De acordo com Mealey et al. (2023), os efeitos neurológicos causados por substratos da gp-P em cães cuja gp-P é disfuncional, advêm mais da capacidade destes fármacos de atravessar a barreira hematoencefálica e não tanto de uma prolongada exposição sistêmica. No entanto, mesmo que os substratos consigam penetrar no cérebro devido a esta quebra protetora da barreira hematoencefálica, tal não significa que irão causar efeitos tóxicos do foro neurológico. Mais importante do que avaliar a concentração cerebral do substrato, é avaliar se existem recetores para o mesmo no SNC. Dos fármacos previamente abordados como causadores de efeitos neurológicos, as lactonas macrocíclicas ligam-se aos recetores GABA nos canais de cloro (Sulik et al. 2023), a apomorfina e a acepromazina ligam-se aos recetores D2 (Kukanich and Papich 2018; Posner 2018) e a loperamida liga-se aos recetores μ (Papich 2018), sendo possível encontrar todos estes recetores no cérebro.

Elmshäuser et al. (2015) mostraram que existe um aumento significativo na penetração de emodepside na barreira hematoencefálica de ratos geneticamente modificados para a mutação MDR1. A concentração cerebral era quase o dobro da concentração plasmática, enquanto nos ratos com uma gp-P normal, não foram detetadas concentrações relevantes no cérebro. Os sinais neurológicos associados, devem-se à sua interferência com os canais de potássio ativados por cálcio (SLO-1) e com os recetores da latrofilina (LAT-1), presentes nos neurónios do SNC (Gaens, Leithäuser, et al. 2019).

2.5.2 Efeitos não Neurológicos

A ausência de uma correta excreção biliar dos substratos da gp-P, leva a que estes se mantenham mais tempo em circulação. Esta é a principal causa dos efeitos não neurológicos observados em cães homozigóticos mutantes MDR1, tal como mencionado anteriormente. (Coelho et al. 2009; Mealey, Fidel, et al. 2008).

Dos fármacos previamente mencionados, são três os que surgem associados a efeitos não neurológicos. A excreção de grapiprant é 71% mais baixa em cães homozigóticos MDR1, causando essencialmente efeitos gastrointestinais (Heit et al. 2021). A vincristina, quer em animais que possuam um ou dois alelos mutantes, surge associada a supressão medular, mais concretamente, neutropenia e trombocitopenia (Mealey, Fidel, et al. 2008). No caso da ciclosporina, é importante ter em conta que a gp-P também é expressa na membrana celular dos linfócitos T, de forma a impedir a acumulação de substâncias no interior das células. Assim, um anormal funcionamento da gp-P irá permitir o aumento da concentração intracelular de ciclosporina, fazendo com que doses que normalmente causariam uma imunossupressão mínima, irão ter efeitos exacerbados (Mackin et al. 2020).

2.6 Opções terapêuticas em cães com mutação MDR1

Os substratos da gp-P que não têm afinidade para os recetores do SNC e aqueles que possuem uma grande margem de segurança, podem não necessitar de doses reduzidas aquando da administração em cães com uma gp-P disfuncional (Mealey et al. 2023).

Os casos devem ser sempre avaliados individualmente, pois fatores como doenças concomitantes e a administração simultânea de outros fármacos, devem ser tidos em conta. A recomendação geral consiste numa redução da dose em 25% para cães heterozigóticos e 50% para cães homozigóticos. Caso se conclua que o animal necessita de uma dose maior e, caso tenha tolerado a dose previamente administrada, poder-se-á recorrer a aumentos de 10% nas doses seguintes (Mealey et al. 2023). A monitorização terapêutica com base nas concentrações plasmáticas dos fármacos não é útil, uma vez que podem não ser significativamente diferentes entre cães com funcionamento normal e anormal da gp-P (Kitamura et al. 2008). Já a monitorização farmacodinâmica, parece ser um método mais fiável (Mackin et al. 2020).

Há certos casos em que o risco de administração de determinado fármaco é tão grande, que é muito mais seguro optar pela substituição do fármaco em vez da redução da dose. É o caso das lactonas macrocíclicas, em que é preferível recorrer a outras alternativas como afoxolaner (Drag et al. 2022), fluralaner e sarolaner (Walther et al. 2014). Quanto ao emodepside (Gaens, Leithäuser, et al. 2019), loperamida e apomorfina (Mealey et al. 2023), não se sabe ao certo qual seria a dose segura para não causar efeitos adversos, pelo que é recomendável optar pela administração de fármacos alternativos.

3. Objetivos

Como mencionado, a presença da mutação no gene *MDR1* canino pode promover reações adversas graves, até mesmo fatais, quando substratos da gp-P, fazendo estes parte da composição de medicamentos frequentemente utilizados na Medicina Veterinária, são administrados a cães homozigóticos para a mutação *MDR1*. Num estudo anterior publicado por Barroso et al. (2022), foram detetados cães heterozigóticos [*MDR1* (+/-)] na raça Barbado da Terceira.

Considerando estes resultados, pensou-se que seria importante obter mais conhecimento e resultados que permitissem continuar a responder à pergunta: "Estará a mutação no gene *MDR1* presente em raças de cães pastores em Portugal?" Assim, um dos principais objetivos foi contribuir para obter as frequências alélicas desta mutação em raças portuguesas de cães pastores, particularmente no Rafeiro do Alentejo.

Estes resultados permitirão fornecer aos Médicos Veterinários informações nacionais/regionais sobre a distribuição da mutação em Portugal e, eventualmente, destacar a necessidade de um teste genético antes de qualquer tratamento com substratos da gp-P nas já mencionadas raças.

Esta informação será também muito útil para os criadores, de forma a evitar o uso de cães homozigóticos para a mutação *MDR1* na reprodução, reduzindo assim a incidência desta mutação nas raças predispostas e até mesmo eliminando a mutação dos reservatórios genéticos, contribuindo para reduzir e evitar reações adversas após a administração de substratos da gp-P.

Por fim, o objetivo é utilizar os resultados para aumentar a probabilidade de sucesso terapêutico e minimizar o risco de reações adversas a medicamentos veterinários em cães pastores portugueses que possuam o gene *MDR1* mutado.

4. Materiais e Métodos

4.1 Colheita de amostras

Este estudo foi aprovado pela Comissão de Ética para a Investigação e Ensino da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa e obteve-se um consentimento por escrito de todos os detentores, aceitando a participação dos seus animais neste estudo.

A amostra populacional é constituída por cães de raças pastoras portuguesas (Rafeiro do Alentejo e Barbado da Terceira) e por cães de outras raças pastoras que já se sabe serem afetadas pela mutação no gene *MDR1* (Bobtail, Pastor Alemão, Pastor Australiano e Pastor de Shetland).

A colheita de amostras ocorreu em diversas instâncias no ano de 2023: durante consultas no HEV-FMV; no Pet Festival, em Lisboa; na 32^a Exposição Canina Monográfica do

Rafeiro do Alentejo, realizada na Feira das Cebolas, em Portalegre; e, por fim, na residência de um criador de Rafeiros do Alentejo, no Seixal.

As amostras foram colhidas através de zaragatoas orais, tendo sido posteriormente armazenadas a -80°C até se iniciar o protocolo laboratorial.

4.2 Extração e quantificação de DNA

O primeiro passo do procedimento laboratorial foi a extração de DNA das zaragatoas orais. Para tal, utilizou-se o *High Pure PCR Template Preparation Kit* (Roche®) (Figura 6), segundo as recomendações do próprio kit: 1) adicionar 200 µl de tampão de ligação (do inglês *Binding Buffer*) + 40 µl de Proteinase K ao eppendorf com a amostra. Misturar imediatamente ao adicionar a Proteinase K; 2) incubar a mistura a 70°C, durante 10 minutos; 3) adicionar 100 µl de Isopropanol, misturar bem e passar a mistura para um eppendorf com filtro, que é colocado dentro de um tubo coletor. Centrifugar 1 minuto a 8000g; 4) descartar tubo coletor + líquido; 5) adicionar 500 µl de tampão de remoção de inibidores (do inglês *Inhibitor Removal Buffer*). Centrifugar 1 minuto a 8000g; 6) repetir passo 4; 7) adicionar 500 µl de tampão de lavagem (do inglês *Wash Buffer*). Centrifugar 1 minuto a 8000g; 8) repetir passo 4; 9) repetir passo 7; 10) descartar apenas o líquido; 11) centrifugar 10 segundos a 13000g; 12) descartar tubo coletor; 13) incubar o tampão de eluição (do inglês *Elution Buffer*) a 70°C, durante 10 minutos. Depois, adicionar 200 µl em cada tubo. Usar eppendorfs como tubos coletores e centrifugar 1 minuto a 8000g; 14) descartar o eppendorf com filtro e armazenar o coletor a -20°C.



Figura 6. Tampões utilizados na extração de DNA (Original)

Uma vez concluída a extração de DNA, todos os produtos obtidos foram quantificados por espectrofotometria no NanoDrop One (Figura 7), para se obterem os valores das concentrações de DNA e dos rácios de pureza A260/A280 e A260/A230. As amostras foram mantidas refrigeradas enquanto se realizam os procedimentos, para que não houvesse degradação do DNA (Figura 8).

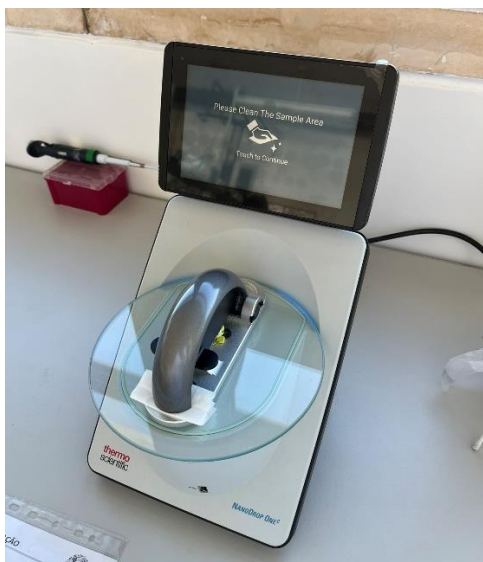


Figura 7. NanoDrop One (Original)

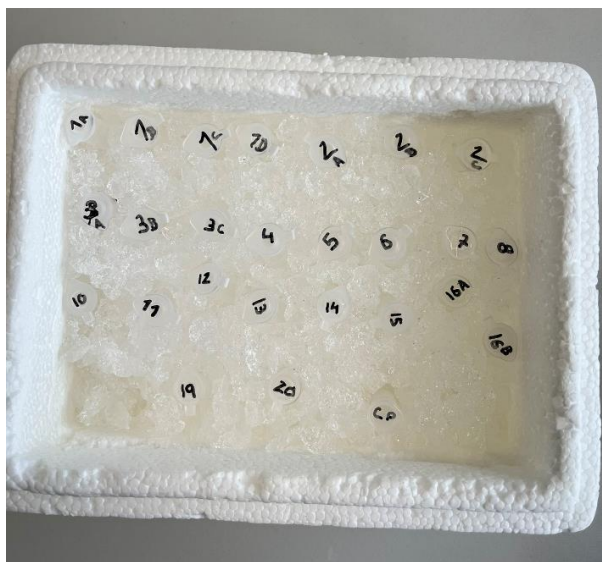


Figura 8. Refrigeração dos produtos obtidos da extração do DNA (Original)

4.3 PCR e eletroforese

De seguida, realizaram-se vários PCR cujo objetivo consiste em amplificar fragmentos específicos de DNA em função dos primers utilizados. Para um volume final de 50 μl por amostra, foram utilizados 20 μl de DNA extraído, 15 μl (5U) de Supreme NZYTaQ II 2x Green Master Mix (DNA Polimerase + dNTPs + buffer + MgCl_2) (Figura 9), 1 μl (0.2 pmol) de Primer Forward (5' - GGC TTG ATA GGT TGT ATA TGT TGG TG - 3'), 1 μl (0.2 pmol) de Primer Reverse (5' - ATT ATA ACT GGA AAA GTT TTG TTT - 3') e 13 μl de água MiliQ.

O protocolo foi realizado numa câmara de fluxo laminar (Figura 10) e foi o seguinte: 1) hidratar os primers, obtendo uma concentração de 100 pmol; 2) diluir os primers, para obter a concentração inicial pretendida de 10 pmol; 3) centrifugar, individualmente, ambos os primers e a Master Mix; 4) misturar os primers, a Master Mix e a água MiliQ; 5) colocar 30 μl da mistura em cada tubo; 6) colocar 20 μl de DNA nos respetivos tubos; 7) preparar o controlo negativo (30 μl de mistura + 20 μl de água MiliQ); 8) preparar o controlo positivo (30 μl de mistura + 20 μl de DNA de um cão com mutação).

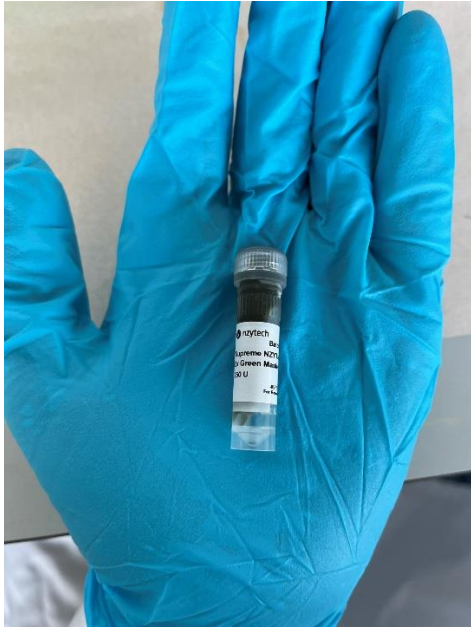


Figura 9. Supreme NZYtaq II 2x Green Master Mix (Original)



Figura 10. Câmara de fluxo laminar (Original)

Após a preparação de todos os tubos, estes foram colocados no termociclador (Figura 11) e realizaram-se os PCR nas seguintes condições: 4 minutos a 94°C; 32 ciclos de 30 segundos a 94°C, 1 minuto a 55°C e 30 segundos a 72°C; 10 minutos a 72°C; 20 minutos a 8°C.

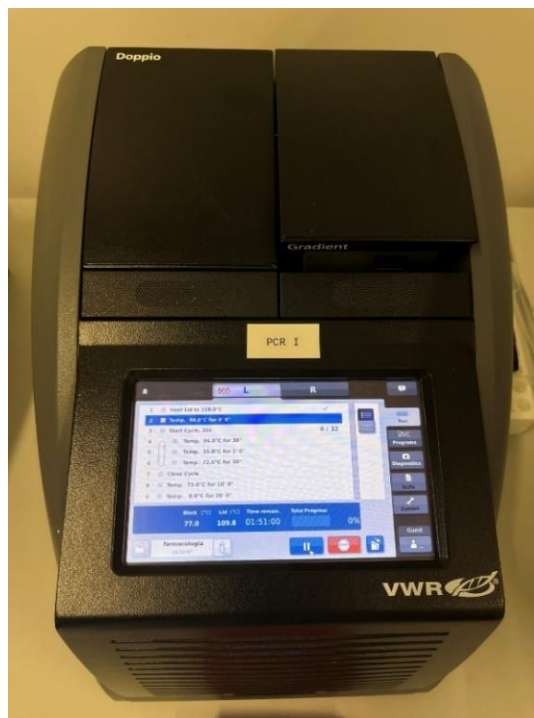


Figura 11. Termociclador (Original)

Após o PCR ter sido realizado, as amostras foram avaliadas por eletroforese num gel de agarose a 2% (Figura 12) e comparadas com um controlo positivo, de forma a perceber se a amplificação do DNA tinha sido bem sucedida. As imagens das eletroforeses foram obtidas no sistema ChemiDoc™ XRS+ (Figura 13).

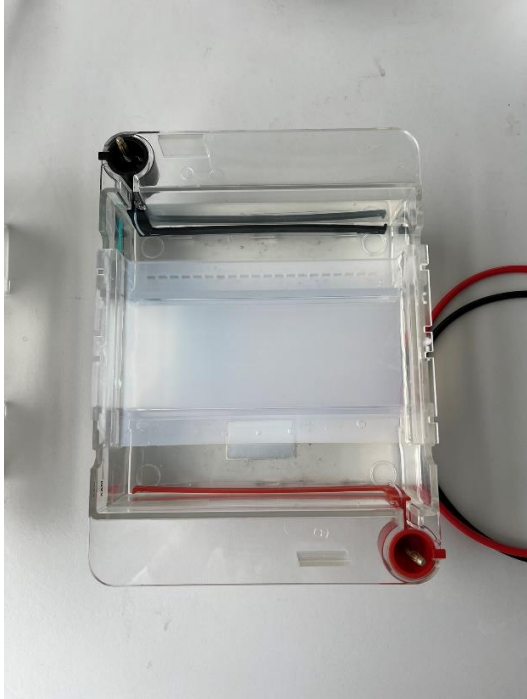


Figura 12. Eletroforese num gel de agarose a 2% (Original)



Figura 13. ChemiDoc™ XRS+ (Original)

4.4 Purificação e sequenciação de DNA

O passo seguinte foi uma purificação de todos os produtos de PCR. O objetivo desta etapa é aumentar a concentração de DNA nas amostras, de forma a possibilitar a sequenciação. Para tal recorreu-se ao kit DNA Clean & Concentrator™-5 da Zymo Research (Figura 14), de acordo com o protocolo do próprio kit: 1) num eppendorf, colocar todo o produto de PCR da amostra (40µl) e adicionar 5x mais de tampão de ligação (do inglês *Binding Buffer*); 2) misturar brevemente no vórtex; 3) colocar a coluna num tubo coletor, para onde passa a mistura; 4) centrifugar 30 segundos a 10.000g. Descartar o líquido no tubo coletor; 5) adicionar 200 µl de tampão de lavagem (do inglês *Wash Buffer*) e centrifugar 30 segundos a 10.000g. Descartar o líquido no tubo coletor; 6) repetir passo 5; 7) centrifugar uma última vez, nas mesmas condições, sem adicionar o tampão de lavagem; 8) descartar o tubo coletor com líquido e colocar a coluna num eppendorf; 9) adicionar 17 µl de tampão de eluição (do inglês *Elution Buffer*)/água e aguardar 3 minutos à temperatura ambiente; 10) centrifugar 1 minuto a 10.000g.



Figura 14. Tampões utilizados na purificação dos produtos de PCR (Original)

De seguida, todas as amostras com uma concentração superior a 10 ng/ μ l, foram enviadas para o laboratório externo STAB VIDA para sequenciação pelo método de Sanger. Através do software Unipro UGENE®, as sequências obtidas foram alinhadas e comparadas com o gene *MDR1* canino (GenBank AF 045016) e avaliaram-se os respetivos eletroferogramas.

4.5 Questionário

Durante a realização do estudo, foi elaborado um questionário (anexo 2) no Google Forms® que foi enviado a todos os detentores que aceitaram participar neste estudo. O questionário continha uma primeira secção para obtenção de dados pessoais dos detentores (nome, contacto telefónico e endereço de e-mail), uma segunda secção onde se pretendia saber com quantos cães participaram no estudo e qual a raça do(s) mesmo(s) e uma terceira secção acerca de informações relativas aos animais. Com esta última secção, para além das características dos próprios animais (nome, sexo e idade), foi perguntado se já tinham realizado algum teste genético para despiste da mutação *MDR1*, com que medicamentos são desparasitados (caso sejam) e se já exibiram algum tipo de efeito adverso após a administração destes ou qualquer um dos outros medicamentos anteriormente mencionados como sendo substratos da gp-P. O tratamento dos dados foi efetuado no Microsoft Excel®.

5. Resultados

5.1 Caracterização da amostra populacional

A amostra populacional deste estudo foi constituída por 61 cães, sendo 45 de raças pastoras portuguesas e 16 de outras raças pastoras já descritas como afetadas pela mutação *MDR1* (tabela 4).

Tabela 4. Caracterização da amostra populacional em estudo quanto à raça

Raça	Total
Barbado da Terceira	3
Bobtail	1
Pastor Alemão	4
Pastor Australiano	10
Pastor de Shetland	1
Rafeiro do Alentejo	42
Total	61

5.2 Eletroforese

Visto que não havia poços suficientes para realizar as eletroforeses de todas as amostras em simultâneo, estas foram divididas em três grupos, correspondentes às figuras 15, 16 e 17.

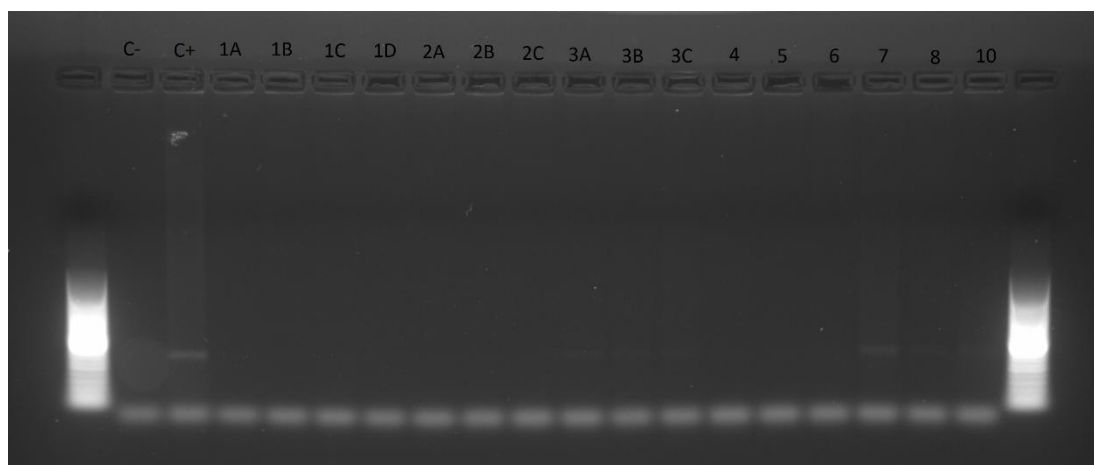


Figura 15. Eletroforese do primeiro conjunto de amostras (Original)

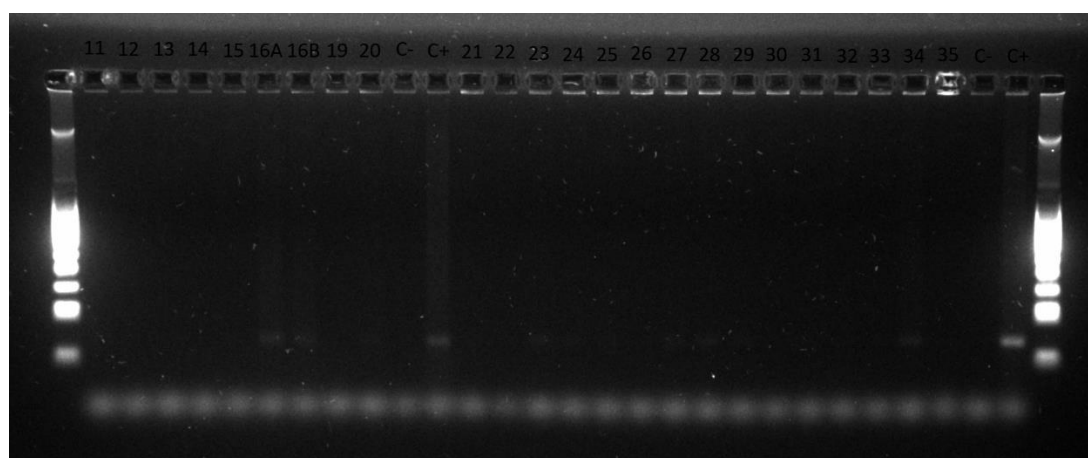


Figura 16. Eletroforese do segundo conjunto de amostras (Original)

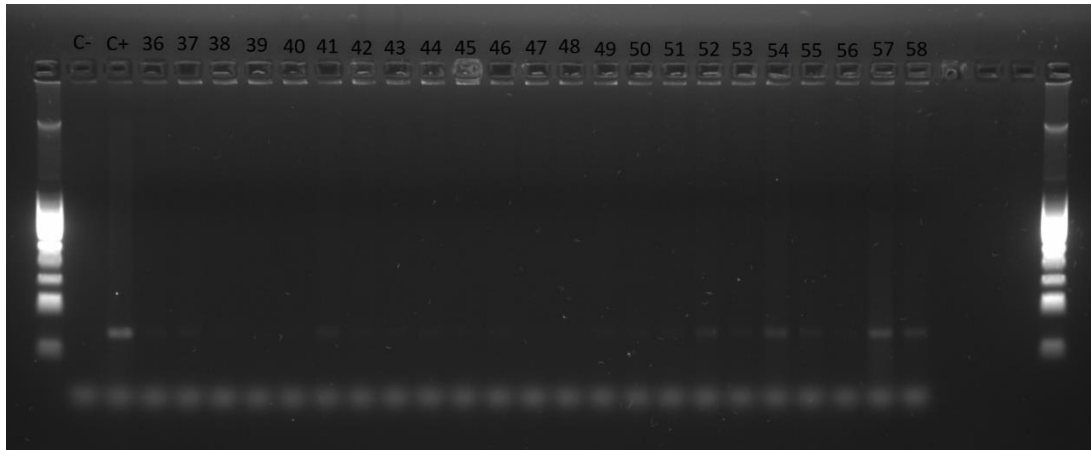


Figura 17. Eletroforese do terceiro conjunto de amostras (Original)

5.3 Sequenciação Sanger

Das 61 amostras totais, 55 foram enviadas para realização de sequenciação Sanger. As restantes 6 amostras (3 Pastores Alemães, 1 Bobtail, 1 Pastor Australiano e 1 Rafeiro do Alentejo), não foram sequenciadas por terem uma concentração inferior a 10 ng/µl.

Na figura 18, observa-se toda a região delimitada pelos primers utilizados. Na figura 19, é possível observar com maior ampliação a região onde ocorre a mutação, verificando-se que não existe nenhum homozigótico mutante, uma vez que não ocorre deleção de 4 pares de bases em nenhuma amostra. A amostra 3C apresenta uma aparente substituição de uma guanina por adenina na posição 295.

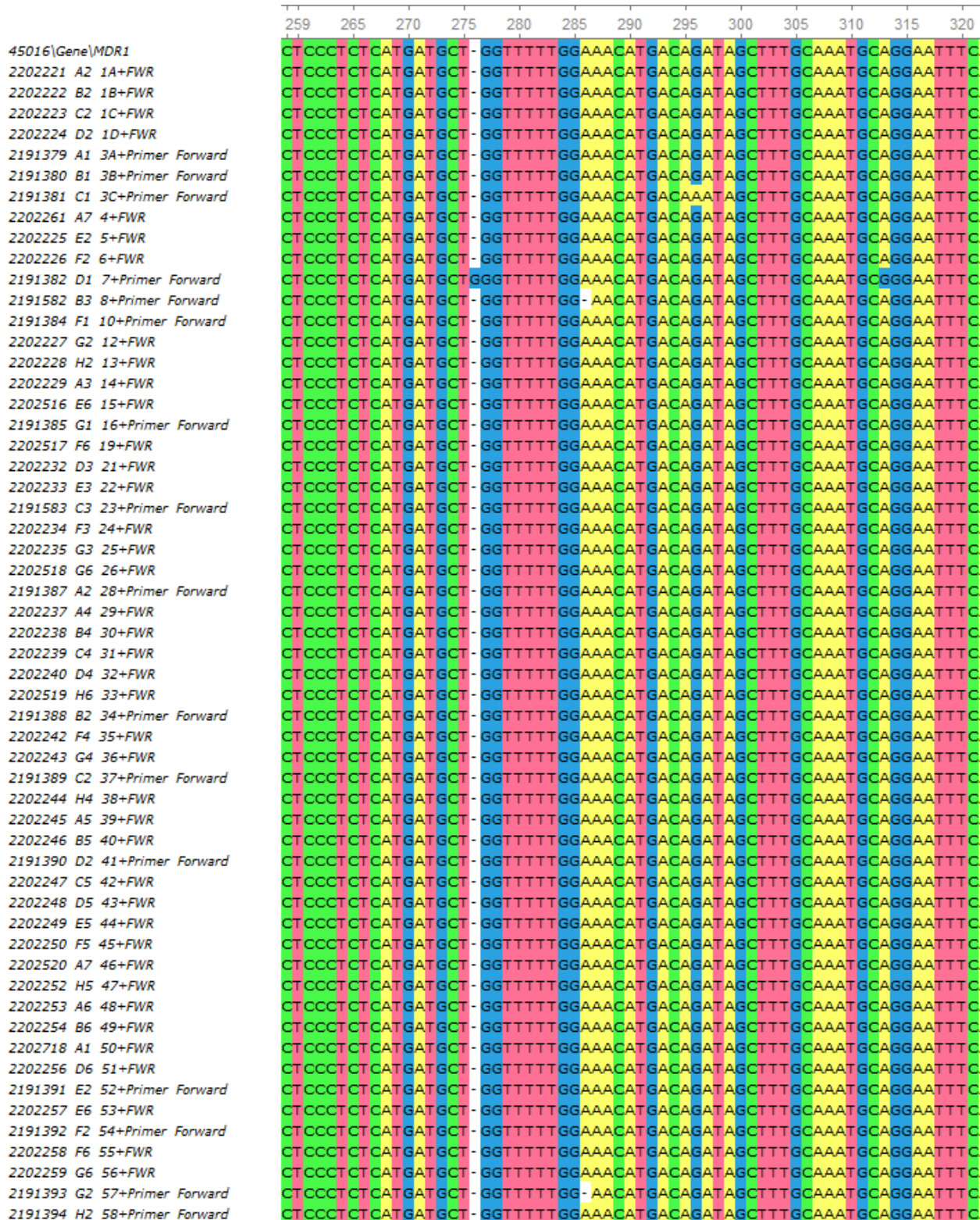


Figura 18. Região de sequenciação das amostras. Esta região situa-se entre os 259 e os 321 pares de base, após alinhamento com o gene *MDR1* canino, visível na primeira linha. À esquerda, encontram-se os números das amostras sequenciadas, ordenados de forma ascendente. (Original)

	286	290	292	294	296	298	300	302	304	306	308	310	312	315																
45016\Gene\MDR1	A	A	C	A	T	G	A	C	A	G	A	T	A	G	C	T	T	T	G	C	A	A	A	T	G	C	A	G	G	
2202221_A2_1A+FWR	A	A	C	A	T	G	A	C	A	G	A	T	A	G	C	T	T	T	G	C	A	A	A	T	G	C	A	G	G	
2202222_B2_1B+FWR	A	A	C	A	T	G	A	C	A	G	A	T	A	G	C	T	T	T	G	C	A	A	A	T	G	C	A	G	G	
2202223_C2_1C+FWR	A	A	C	A	T	G	A	C	A	G	A	T	A	G	C	T	T	T	G	C	A	A	A	T	G	C	A	G	G	
2202224_D2_1D+FWR	A	A	C	A	T	G	A	C	A	G	A	T	A	G	C	T	T	T	G	C	A	A	A	T	G	C	A	G	G	
2191379_A1_3A+Primer_Forward	A	A	C	A	T	G	A	C	A	G	A	T	A	G	C	T	T	T	G	C	A	A	A	T	G	C	A	G	G	
2191380_B1_3B+Primer_Forward	A	A	C	A	T	G	A	C	A	G	A	T	A	G	C	T	T	T	G	C	A	A	A	T	G	C	A	G	G	
2191381_C1_3C+Primer_Forward	A	A	C	A	T	G	A	C	A	G	A	T	A	G	C	T	T	T	G	C	A	A	A	T	G	C	A	G	G	
2202261_A7_4+FWR	A	A	C	A	T	G	A	C	A	G	A	T	A	G	C	T	T	T	G	C	A	A	A	T	G	C	A	G	G	
2202225_E2_5+FWR	A	A	C	A	T	G	A	C	A	G	A	T	A	G	C	T	T	T	G	C	A	A	A	T	G	C	A	G	G	
2202226_F2_6+FWR	A	A	C	A	T	G	A	C	A	G	A	T	A	G	C	T	T	T	G	C	A	A	A	T	G	C	A	G	G	
2191382_D1_7+Primer_Forward	A	A	C	A	T	G	A	C	A	G	A	T	A	G	C	T	T	T	G	C	A	A	A	T	G	C	A	G	G	
2191582_B3_8+Primer_Forward	-	A	A	C	A	T	G	A	C	A	G	A	T	A	G	C	T	T	T	G	C	A	A	A	T	G	C	A	G	G
2191384_F1_10+Primer_Forward	A	A	C	A	T	G	A	C	A	G	A	T	A	G	C	T	T	T	G	C	A	A	A	T	G	C	A	G	G	
2202227_G2_12+FWR	A	A	C	A	T	G	A	C	A	G	A	T	A	G	C	T	T	T	G	C	A	A	A	T	G	C	A	G	G	
2202228_H2_13+FWR	A	A	C	A	T	G	A	C	A	G	A	T	A	G	C	T	T	T	G	C	A	A	A	T	G	C	A	G	G	
2202229_A3_14+FWR	A	A	C	A	T	G	A	C	A	G	A	T	A	G	C	T	T	T	G	C	A	A	A	T	G	C	A	G	G	
2202516_E6_15+FWR	A	A	C	A	T	G	A	C	A	G	A	T	A	G	C	T	T	T	G	C	A	A	A	T	G	C	A	G	G	
2191385_G1_16+Primer_Forward	A	A	C	A	T	G	A	C	A	G	A	T	A	G	C	T	T	T	G	C	A	A	A	T	G	C	A	G	G	
2202517_F6_19+FWR	A	A	C	A	T	G	A	C	A	G	A	T	A	G	C	T	T	T	G	C	A	A	A	T	G	C	A	G	G	
2202232_D3_21+FWR	A	A	C	A	T	G	A	C	A	G	A	T	A	G	C	T	T	T	G	C	A	A	A	T	G	C	A	G	G	
2202233_E3_22+FWR	A	A	C	A	T	G	A	C	A	G	A	T	A	G	C	T	T	T	G	C	A	A	A	T	G	C	A	G	G	
2191583_C3_23+Primer_Forward	A	A	C	A	T	G	A	C	A	G	A	T	A	G	C	T	T	T	G	C	A	A	A	T	G	C	A	G	G	
2202234_F3_24+FWR	A	A	C	A	T	G	A	C	A	G	A	T	A	G	C	T	T	T	G	C	A	A	A	T	G	C	A	G	G	
2202235_G3_25+FWR	A	A	C	A	T	G	A	C	A	G	A	T	A	G	C	T	T	T	G	C	A	A	A	T	G	C	A	G	G	
2202518_G6_26+FWR	A	A	C	A	T	G	A	C	A	G	A	T	A	G	C	T	T	T	G	C	A	A	A	T	G	C	A	G	G	
2191387_A2_28+Primer_Forward	A	A	C	A	T	G	A	C	A	G	A	T	A	G	C	T	T	T	G	C	A	A	A	T	G	C	A	G	G	
2202237_A4_29+FWR	A	A	C	A	T	G	A	C	A	G	A	T	A	G	C	T	T	T	G	C	A	A	A	T	G	C	A	G	G	
2202238_B4_30+FWR	A	A	C	A	T	G	A	C	A	G	A	T	A	G	C	T	T	T	G	C	A	A	A	T	G	C	A	G	G	
2202239_C4_31+FWR	A	A	C	A	T	G	A	C	A	G	A	T	A	G	C	T	T	T	G	C	A	A	A	T	G	C	A	G	G	
2202240_D4_32+FWR	A	A	C	A	T	G	A	C	A	G	A	T	A	G	C	T	T	T	G	C	A	A	A	T	G	C	A	G	G	
2202519_H6_33+FWR	A	A	C	A	T	G	A	C	A	G	A	T	A	G	C	T	T	T	G	C	A	A	A	T	G	C	A	G	G	
2191388_B2_34+Primer_Forward	A	A	C	A	T	G	A	C	A	G	A	T	A	G	C	T	T	T	G	C	A	A	A	T	G	C	A	G	G	
2202242_F4_35+FWR	A	A	C	A	T	G	A	C	A	G	A	T	A	G	C	T	T	T	G	C	A	A	A	T	G	C	A	G	G	
2202243_G4_36+FWR	A	A	C	A	T	G	A	C	A	G	A	T	A	G	C	T	T	T	G	C	A	A	A	T	G	C	A	G	G	
2191389_C2_37+Primer_Forward	A	A	C	A	T	G	A	C	A	G	A	T	A	G	C	T	T	T	G	C	A	A	A	T	G	C	A	G	G	
2202244_H4_38+FWR	A	A	C	A	T	G	A	C	A	G	A	T	A	G	C	T	T	T	G	C	A	A	A	T	G	C	A	G	G	
2202245_A5_39+FWR	A	A	C	A	T	G	A	C	A	G	A	T	A	G	C	T	T	T	G	C	A	A	A	T	G	C	A	G	G	
2202246_B5_40+FWR	A	A	C	A	T	G	A	C	A	G	A	T	A	G	C	T	T	T	G	C	A	A	A	T	G	C	A	G	G	
2191390_D2_41+Primer_Forward	A	A	C	A	T	G	A	C	A	G	A	T	A	G	C	T	T	T	G	C	A	A	A	T	G	C	A	G	G	
2202247_C5_42+FWR	A	A	C	A	T	G	A	C	A	G	A	T	A	G	C	T	T	T	G	C	A	A	A	T	G	C	A	G	G	
2202248_D5_43+FWR	A	A	C	A	T	G	A	C	A	G	A	T	A	G	C	T	T	T	G	C	A	A	A	T	G	C	A	G	G	
2202249_E5_44+FWR	A	A	C	A	T	G	A	C	A	G	A	T	A	G	C	T	T	T	G	C	A	A	A	T	G	C	A	G	G	
2202250_F5_45+FWR	A	A	C	A	T	G	A	C	A	G	A	T	A	G	C	T	T	T	G	C	A	A	A	T	G	C	A	G	G	
2202520_A7_46+FWR	A	A	C	A	T	G	A	C	A	G	A	T	A	G	C	T	T	T	G	C	A	A	A	T	G	C	A	G	G	
2202252_H5_47+FWR	A	A	C	A	T	G	A	C	A	G	A	T	A	G	C	T	T	T	G	C	A	A	A	T	G	C	A	G	G	
2202253_A6_48+FWR	A	A	C	A	T	G	A	C	A	G	A	T	A	G	C	T	T	T	G	C	A	A	A	T	G	C	A	G	G	
2202254_B6_49+FWR	A	A	C	A	T	G	A	C	A	G	A	T	A	G	C	T	T	T	G	C	A	A	A	T	G	C	A	G	G	
2202718_A1_50+FWR	A	A	C	A	T	G	A	C	A	G	A	T	A	G	C	T	T	T	G	C	A	A	A	T	G	C	A	G	G	
2202256_D6_51+FWR	A	A	C	A	T	G	A	C	A	G	A	T	A	G	C	T	T	T	G	C	A	A	A	T	G	C	A	G	G	
2191391_E2_52+Primer_Forward	A	A	C	A	T	G	A	C	A	G	A	T	A	G	C	T	T	T	G	C	A	A	A	T	G	C	A	G	G	
2202257_E6_53+FWR	A	A	C	A	T	G	A	C	A	G	A	T	A	G	C	T	T	T	G	C	A	A	A	T	G	C	A	G	G	
2191392_F2_54+Primer_Forward	A	A	C	A	T	G	A	C	A	G	A	T	A	G	C	T	T	T	G	C	A	A	A	T	G	C	A	G	G	
2202258_F6_55+FWR	A	A	C	A	T	G	A	C	A	G	A	T	A	G	C	T	T	T	G	C	A	A	A	T	G	C	A	G	G	
2202259_G6_56+FWR	A	A	C	A	T	G	A	C	A	G	A	T	A	G	C	T	T	T	G	C	A	A	A	T	G	C	A	G	G	
2191393_G2_57+Primer_Forward	-	A	A	C	A	T	G	A	C	A	G	A	T	A	G	C	T	T	T	G	C	A	A	A	T	G	C	A	G	G
2191394_H2_58+Primer_Forward	A	A	C	A	T	G	A	C	A	G	A	T	A	G	C	T	T	T	G	C	A	A	A	T	G	C	A	G	G	

Figura 19. Imagem aproximada da zona da mutação. A zona de interesse encontra-se destacada com um retângulo preto (294-299 pares de bases). Dentro deste intervalo, apenas a amostra 3C apresenta uma alteração, com a substituição de uma guanina por adenina na posição 295. (Original)

Por último, após a avaliação dos eletroferogramas de todas as amostras sequenciadas, chegou-se à conclusão de que apenas um era compatível com heterozigotia (figura 20), sendo este pertencente a um cão da raça Pastor Australiano. Se por um lado houve três animais que apresentaram um eletroferograma dúbio (figura 21), os restantes são claramente homozigóticos *wild-type* (figura 22).

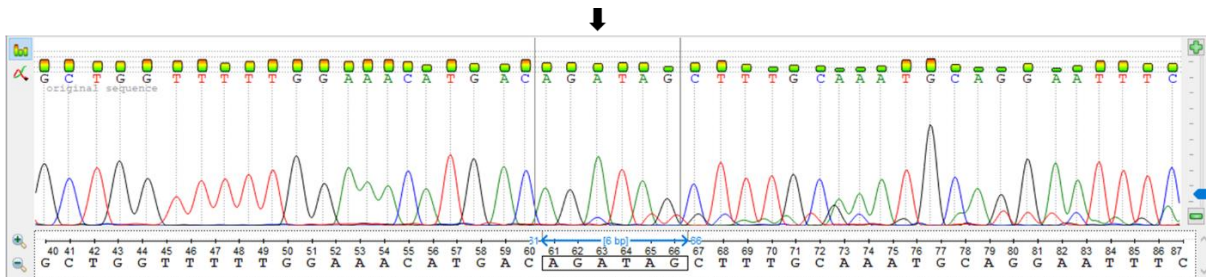


Figura 20. Genótipo heterozigótico. Na posição assinalada pela seta (correspondente à posição 296 no gene *MDR1*), é possível observar um pico azul perfeitamente alinhado por baixo de um pico verde. Este duplo pico significa que um dos alelos expressa adenina (verde) e o outro alelo expressa citosina (azul). É importante realçar a diferença do gráfico antes e depois da mutação: picos limpos e isolados em contraste com múltiplos duplos picos que se formam após a mutação.

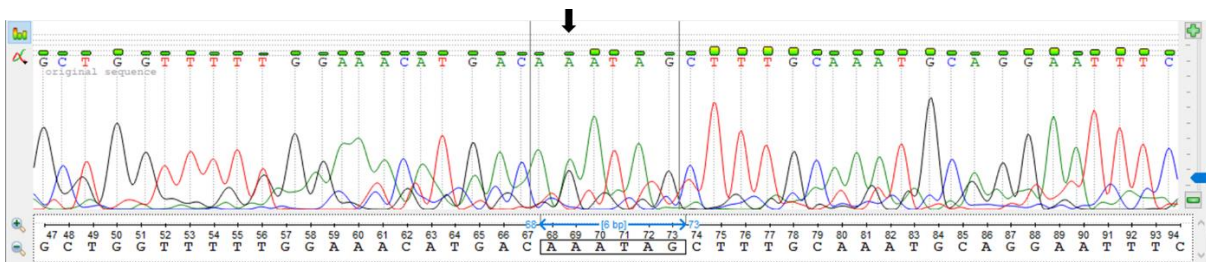


Figura 21. Eletroferograma dúbio. Ao contrário do exemplo anterior, o gráfico já era muito confuso, com picos sobrepostos e distorcidos antes da região da mutação. Nota para a posição assinalada pela seta (295), onde surge a já mencionada substituição de guanina por adenina.

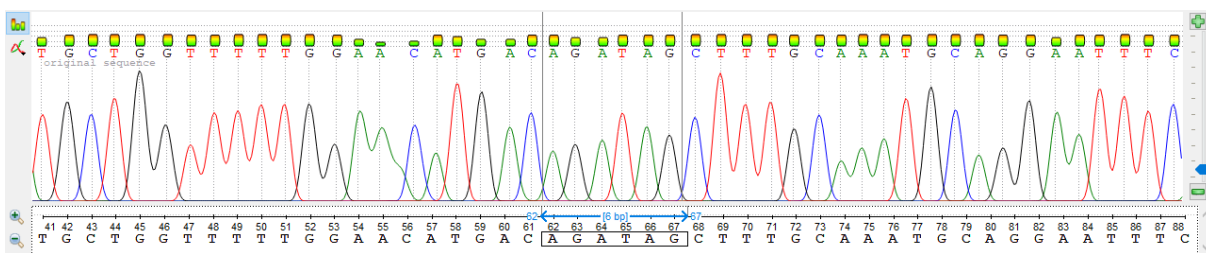
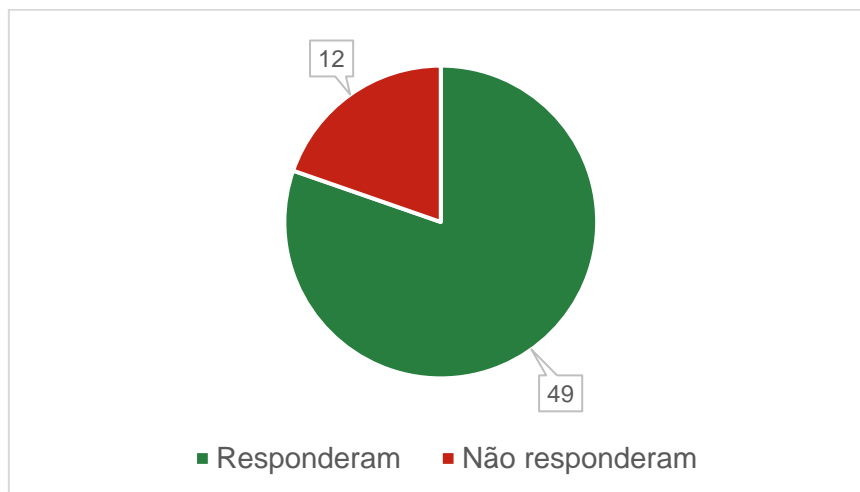


Figura 22. Genótipo *wild-type*. Ambos os alelos expressam a sequência correta e os picos são distintos, quer na região da mutação, quer após.

5.4 Questionário

Dos 61 cães incluídos neste estudo, conseguiu-se recolher informações de 49 (80,3%). No que diz respeito aos restantes 12 cães (19,7%), os respetivos detentores não preencheram o questionário (gráfico 3). Nas 49 respostas obtidas, estão contemplados o animal de genótipo heterozigótico e os 3 animais com resultados dúbios. É também importante referir que houve 3 respostas obtidas pertencentes a animais cujas amostras não foram sequenciadas pelos motivos já mencionados.

Gráfico 3. Frequência absoluta de respostas obtidas no questionário



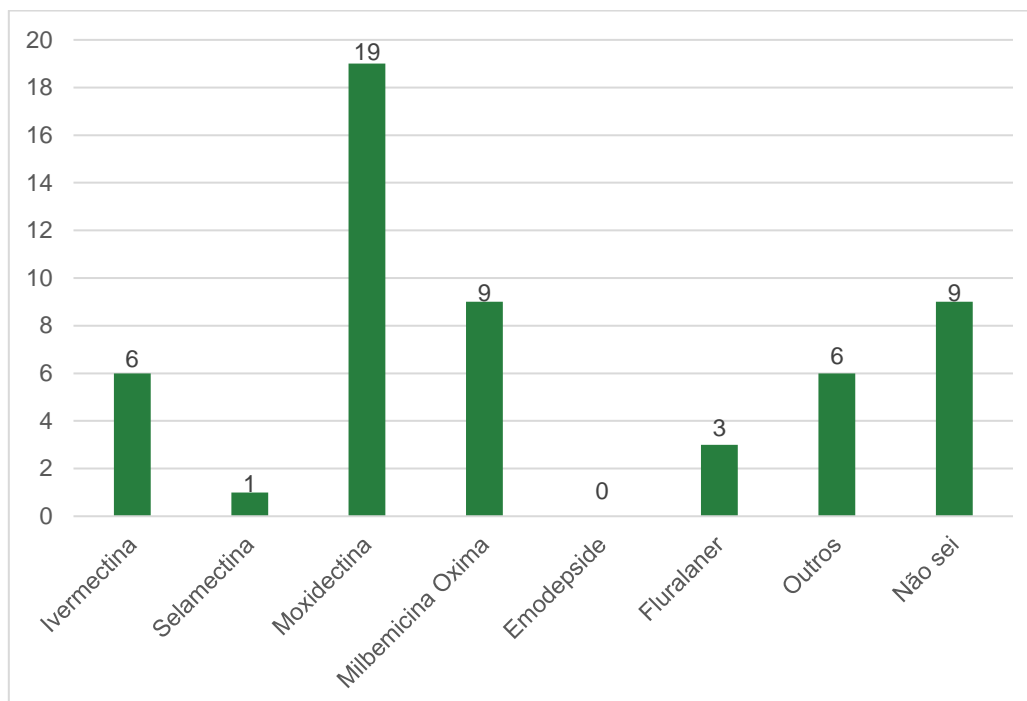
Para 44 cães (89,8%), esta foi a primeira vez que testaram a presença da mutação MDR1. Em contrapartida, 5 cães (10,2%) já tinham realizado o despiste previamente (gráfico 4). Destes 5, os resultados apresentados foram 1 heterozigótico e 4 *wild-type*.

Gráfico 4. Frequência absoluta da realização de um teste prévio para deteção da mutação MDR1



Quanto aos hábitos de desparasitação, apenas um cão não é desparasitado externamente. O antiparasitário mais utilizado é a moxidectina (35,8%), seguido da milbemicina oxima (17%) e ivermectina (11,3%). Apenas 1 cão é desparasitado com selamectina (1,9%) e nenhum recorre ao emodepside. 5,7% são desparasitados com fluralaner, 11,3% utilizam outros antiparasitários não influenciados pela gp-P e em 17% dos casos os detentores não souberam responder.

Gráfico 5. Frequência absoluta dos antiparasitários externos utilizados



Relativamente à observação de efeitos adversos associados a qualquer medicamento, o único caso relatado foi o do cão com genótipo heterozigótico que, segundo a detentora, chegou a vomitar e desmaiar após a administração de fluralaner.

6. Discussão

Após a extração de DNA, todas as amostras foram lidas por espectrofotometria no NanoDrop One, com o intuito de se obter os valores das concentrações de DNA e respetivos rácios de pureza A260/A280 e A260/A230. Segundo Koetsier e Cantor (2024), os rácios de pureza não têm qualquer utilidade se as concentrações forem inferiores a 20 ng/ μ l, que é o que se verifica em todas as amostras. Para contornar estes baixos valores de concentração, poder-se-iam ter feito várias réplicas de cada uma das amostras e juntado numa só, aumentando assim a concentração. No entanto, tal não aconteceu, pelo que não será possível proceder à avaliação dos rácios de pureza. Embora não seja essencial para este estudo, a avaliação dos rácios de pureza seria interessante como controlo de qualidade da fase inicial do protocolo laboratorial. Há vários motivos que poderão ser a causa da obtenção destes

baixos valores de concentração de DNA, tais como a técnica de colheita das amostras, o tempo decorrido entre a colheita das amostras e a extração de DNA, a técnica aplicada na extração de DNA e a própria utilização da saliva como amostra, em vez de sangue.

Esta baixa concentração de DNA nas amostras também se reflete na qualidade das eletroforeses apresentadas. Os primers utilizados tinham como intuito amplificar uma região específica do gene *MDR1*, na qual está contida a região da mutação. Logo, o expectável seria que todas as amostras apresentassem uma banda forte na eletroforese, mas tal não aconteceu e as baixas concentrações de DNA podem justificar este acontecimento.

Tal como mencionado anteriormente, a mutação no gene *MDR1* consiste numa deleção de 4 pares de bases no codão 294, que corresponde aos nucleótidos AGA (adenina, guanina, adenina). Uma vez que esta deleção pode ter início em qualquer um dos nucleótidos do codão 294, existem três combinações possíveis de deleção de nucleótidos (figura 23).



Figura 23. Combinações possíveis de deleções de nucleótidos no gene *MDR1*. Na primeira linha encontra-se a sequência *wild-type*, com a região da mutação contida num retângulo. Nas linhas seguintes, é possível observar as diferentes combinações de deleção de nucleótidos, caso esta inicie no primeiro, segundo ou terceiro nucleótido do codão 294, e as sequências resultantes após as deleções. (Original)

Através da análise da figura 23, é possível concluir dois aspetos: em primeiro lugar, independentemente dos nucleótidos que forem deletados, a sequência resultante será igual nos três cenários e esta mesma sequência será aquela apresentada pelos indivíduos homocigóticos mutantes, isto é, com deleção dos 4 pares de bases em ambos os alelos. Por outro lado, é também uma ferramenta útil para analisar os eletroferogramas de indivíduos heterocigóticos, uma vez que torna mais fácil a identificação dos picos de nucleótidos que se podem sobrepor. Tomando como exemplo o único indivíduo heterocigótico identificado neste estudo (figura 20), observou-se um pico azul (citosina) perfeitamente alinhado por baixo de um pico verde (adenina). Esta combinação vai ao encontro do que foi anteriormente descrito na figura 23, onde se pode ver que em conjunto com a segunda adenina da região de mutação, deverá estar uma citosina.

Relativamente à figura 21, é um exemplo de três eletroferogramas cuja interpretação não foi tão clara. À primeira vista, aparentam ter vários duplos picos e alguns até são

compatíveis com as combinações apresentadas na figura 23. No entanto, este padrão de desarranjo e até mesmo de sobreposição de picos, já se verifica antes da região da mutação, nos três eletroferogramas, o que leva a crer que será mais plausível pensar que poderá ter ocorrido algum tipo de contaminação da amostra ou até mesmo erro na leitura. Quanto à substituição da guanina por adenina na sequência da figura 21, ao analisar o eletroferograma é possível observar que o pico de guanina está imediatamente abaixo do pico de adenina e o mais provável é que não tenha existido nenhuma mutação de substituição de nucleótidos, mas sim um erro na leitura. A única solução para esclarecer estas questões seria repetir as sequenciações destas três amostras, múltiplas vezes, e comparar os resultados.

No que concerne às raças, a amostra heterozigótica pertence a um Pastor Australiano e as três amostras dúbias pertencem a três raças distintas: Pastor Australiano, Pastor de Shetland e Rafeiro do Alentejo. Com exceção do Rafeiro do Alentejo, todas as outras raças já possuem evidência científica de serem portadores de pelo menos um alelo e tendo em conta que neste estudo apenas se identificou um genótipo heterozigótico num Pastor Australiano ($1/10 = 10\%$), esta será a única raça passível de comparação com outros estudos. Estes 10% não são de todo compatíveis com os valores mencionados noutros estudos, como por exemplo os 59% apresentados por Barroso et al. (2022) ou os 50% referidos por Mealey et al. (2023). No entanto, é importante ressaltar que o baixo número de animais amostrados por raça, torna difícil a comparação com outros estudos relativamente à frequência da mutação MDR1.

Em contraste com o estudo publicado por Barroso et al. (2022), onde foram detetados genótipos heterozigóticos na raça Barbado da Terceira, não foi possível confirmar esses resultados neste estudo, devido ao facto de termos apenas três animais desta raça e todos apresentarem um genótipo *wild-type*.

A realização do questionário contemplou dois objetivos. O principal objetivo foi a identificação de elementos associados a uma possível mutação no gene *MDR1*, porque se algum destes animais tivesse tido uma ou mais reações adversas a um substrato da gp-P, a probabilidade de ter pelo menos um alelo mutante era maior. Para além disso, também foi importante perceber se os resultados deste estudo são compatíveis com aqueles obtidos por alguns detentores noutros testes genéticos realizados previamente para despiste desta mutação.

Quanto aos resultados do questionário, há três aspetos que merecem especial relevância. Em primeiro lugar, apenas foram relatados efeitos adversos num cão, mais em concreto, vômitos e desmaios associados à administração de fluralaner no cão heterozigótico. Quando a detentora realizou o teste prévio e tomou conhecimento da heterozigotia do cão,

optou por utilizar repelentes naturais, tais como sprays à base de citronela e coleiras EM® (do inglês *Effective Microorganisms*) que combinam vários microrganismos, mais concretamente bactérias ácido lácticas, leveduras e bactérias fototróficas (EMRO c2016). Aos dias de hoje, não existe evidência de que o fluralaner seja um substrato da gp-P. No entanto, segundo Geyer et al. (2018, p. 2-4), citado por Gaens, Rummel, et al. (2019, p.3), "...foi demonstrado um aumento significativo da penetração cerebral de fluralaner num modelo de ratinho homozigótico mutante MDR1, indicando que o sistema de efluxo de fármacos mediado pelo gene *MDR1*, impede a entrada de fluralaner no cérebro". Por outro lado, um estudo demonstrou que não foram observados quaisquer efeitos adversos em cães homozigóticos mutantes aquando da administração do triplo da dose recomendada de fluralaner (Walther et al. 2014). Segundo Gaens, Rummel, et al. (2019), são necessários mais estudos para avaliar os potenciais alvos moleculares do fluralaner a nível cerebral dos vertebrados e para identificar outros fatores que possam alterar a resistência a este fármaco. Assim, embora pareça improvável, não se pode dizer com certeza que os vômitos e desmaios observados pela detentora não tenham sido causados pelo fluralaner.

Em segundo lugar, é importante referir que a soma das várias opções mencionadas no gráfico 5 (53), é superior ao número de respostas obtidas no questionário (49), porque alguns detentores mencionaram mais do que um antiparasitário. Tal pode-se dever a uma simples alternância entre fármacos ou ao facto de utilizarem uma associação que atinja um maior espectro de parasitas.

Por último, destacar também que, para os cães que já tinham realizado previamente o despiste desta mutação, os resultados de ambos os testes são concordantes. Assim, ambos os objetivos do questionário foram cumpridos.

Existem muitas técnicas para a deteção da mutação do gene *MDR1* descritas em diferentes estudos (Mealey et al. 2002; Hugnet et al. 2004; Stiedl and Weber 2017; Sousa et al. 2020; Galindo et al. 2021). Neste estudo, optou-se por realizar PCR seguido de sequenciação, para avaliar se esta combinação de técnicas menos dispendiosas eram eficazes. A sequenciação é muito importante para avaliar a fundo as sequências de DNA, mas é um processo mais demorado e sujeito ao erro humano aquando da interpretação dos eletroferogramas, pelo que se poderia recorrer a outros PCR para obter resultados mais rápidos. Para além disso, também se poderiam ter utilizado primers que detetassem logo as mutações e não apenas o gene *MDR1* canino, simplificando o processo. Fica também a dúvida se a utilização de sangue em detrimento da saliva colhida através das zaragatoas orais como amostra, permitiria obter melhores concentrações de DNA e menos contaminantes.

O principal objetivo deste estudo era averiguar uma possível presença da mutação no gene *MDR1* no Rafeiro do Alentejo e, com base nisso, os resultados são favoráveis para a raça. Embora um dos eletroferogramas dúbios seja de um Rafeiro do Alentejo, a verdade é que o traçado é mais compatível com contaminação ou erro de leitura da máquina, do que com a presença de heterozigotia. No entanto, é também importante ter em conta que apenas 42 cães foram testados e, tal como mencionado anteriormente, em 2023 estavam registados 212 no CPC (19,8%). A amostra é pequena, pelo que não é possível alegar que a mutação não existe na população do Rafeiro do Alentejo, mas sim que não foi detetada na amostra testada. Posto isto, e até prova em contrário, não há motivo para desaconselhar a criação da raça Rafeiro do Alentejo, mas os detentores devem permanecer atentos a possíveis sinais adversos, quer neurológicos, quer não neurológicos, aquando da administração dos fármacos já mencionados como substratos da gp-P.

Para ajudar ao esclarecimento deste eventual problema, foi enviado a todos os detentores um folheto informativo (anexo 3) com informação sobre a mutação no gene *MDR1*, quais os fármacos que estão associados ao surgimento de efeitos adversos, que raças são afetadas e quais os cuidados a ter.

7. Conclusão

Em suma, todos os objetivos propostos para este estudo foram cumpridos. Não se encontraram quaisquer indivíduos da raça Rafeiro do Alentejo com pelo menos um alelo mutante, mas recomenda-se a realização de mais estudos nesta raça recorrendo a outros meios de diagnóstico mais rápidos e eficazes. Será também muito importante realizar mais estudos nas restantes raças pastoras portuguesas, preferencialmente com amostras mais representativas.

8. Bibliografia

- Ahmed Juvale II, Abdul Hamid AA, Abd Halim KB, Che Has AT. 2022. P-glycoprotein: new insights into structure, physiological function, regulation and alterations in disease. *Heliyon*. 8(6):e09777. doi:10.1016/j.heliyon.2022.e09777.
- Aidasani D, Zaya MJ, Malpas PB, Locuson CW. 2008. In Vitro Drug-Drug Interaction Screens for Canine Veterinary Medicines: Evaluation of Cytochrome P450 Reversible Inhibition. *Drug Metabolism and Disposition*. 36(8):1512–1518. doi:10.1124/dmd.108.021196.
- Aller SG, Yu J, Ward A, Weng Y, Chittaboina S, Zhuo R, Harrell PM, Trinh YT, Zhang Q, Urbatsch IL, et al. 2009. Structure of P-glycoprotein Reveals a Molecular Basis for Poly-Specific Drug Binding. *Science*. 323(5922):1718. doi:10.1126/science.1168750.
- Alpoim JA. 1999. O Rafeiro do Alentejo - Monografia da raça. Câmara Municipal de Monforte.
- Barbet JL, Snook T, Gay JM, Mealey KL. 2009. ABCB1-1Δ (MDR1-1Δ) genotype is associated with adverse reactions in dogs treated with milbemycin oxime for generalized demodicosis. *Vet Dermatol*. 20(2):111–114. doi:10.1111/j.1365-3164.2008.00725.x.
- Barroso MC, Grilo A, Aguiar S, Aires da Silva F, São Braz B. 2022. Occurrence of MDR1 1-delta mutation in herding dog breeds in Portugal. *Front Vet Sci*. 9. doi:10.3389/fvets.2022.990884.
- Benet LZ. 2009. The drug transporter-metabolism alliance: Uncovering and defining the interplay. *Mol Pharm*. 6(6):1631–1643. doi:10.1021/mp900253n.
- Boehringer Ingelheim Animal Health USA Inc. 2023. Drug Label Information - Heartgard Plus - ivermectin and pyrantel pamoate tablet, chewable. DailyMed; [acedido em 2024 Abr 11]. <https://dailymed.nlm.nih.gov/dailymed/drugInfo.cfm?setid=595a4883-6b37-4190-9579-a2c7ca4738eb>
- Campbell O, de Lorimier LP, Mealey KL. 2017. Adverse reaction to apomorphine in a Collie homozygous for the ABCB1-1Δ (MDR1) mutation. *Journal of Small Animal Practice*. 58(2):119–119. doi:10.1111/jsap.12618.
- Cavalli-Sforza L, Menozzi P, Piazza A. 1994. The history and geography of human genes. Princeton, New Jersey: Princeton University Press. doi:10.2307/2058750.
- Chufan EE, Sim HM, Ambudkar S V. 2015. Molecular Basis of the Polyspecificity of P-Glycoprotein (ABCB1): Recent Biochemical and Structural Studies. *Adv Cancer Res*. 125:71. doi:10.1016/bs.acr.2014.10.003.
- Clube Português de Canicultura. 2023. Relatório e Contas. Lisboa; [acedido em 2024 Ago 28]. <https://www.cpc.pt/o-cpc/relatorios-e-contas/>
- Coelho JC, Tucker R, Mattoon J, Roberts G, Waiting DK, Mealey KL. 2009. Biliary excretion of technetium-99m-sestamibi in wild-type dogs and in dogs with intrinsic (ABCB1-1Δ mutation) and extrinsic (ketoconazole treated) P-glycoprotein deficiency. *J Vet Pharmacol Ther*. 32(5):417–421. doi:10.1111/j.1365-2885.2009.01068.x.
- Combe I. 1987. Herding Dogs: Their Origins and Development in Britain. 1st ed. London: Faber & Faber.
- Cruz C. 2007. As raças portuguesas de cães de gado e de pastoreio - aspectos morfológicos e comportamentais [dissertação de mestrado]. Lisboa: Faculdade de Medicina Veterinária e Instituto Superior de Agronomia.
- Deshpande D, Hill KE, Mealey KL, Chambers JP, Giese MA. 2016. The Effect of the Canine ABCB1-1Δ Mutation on Sedation after Intravenous Administration of Acepromazine. *J Vet Intern Med*. 30(2):636–641. doi:10.1111/jvim.13827.

- Direção Geral de Alimentação e Veterinária. 2020. Resumo das Características do Medicamento Veterinário - Heartgard 30 plus. <https://medvet.dgav.pt/products/51538-heartgard-30-plus-136-ug-114-mg-comprimidos-para-mastigar-para-caes-10297>
- Direção Geral de Alimentação e Veterinária. 2021. Resumo das Características do Medicamento Veterinário - Apovomin. <https://medvet.dgav.pt/products/1218-01-18fvpt-apovomin-3-mg-ml-solucao-injetavel-para-caes-11514>
- Direção Geral de Alimentação e Veterinária. 2023a. Resumo das Características do Medicamento Veterinário - Milbemax. <https://medvet.dgav.pt/products/51470-milbemax-comprimidos-para-caes-11082>
- Direção Geral de Alimentação e Veterinária. 2023b. Resumo das Características do Medicamento Veterinário - Calmivet. <https://medvet.dgav.pt/products/696-01-13nfvpt-calmivet-5-mg-ml-solucao-injetavel-para-equinos-caes-e-gatos-10042>
- Direção Geral de Alimentação e Veterinária. 2023c. Resumo das Características do Medicamento Veterinário - Atopica. <https://medvet.dgav.pt/products/51486-atopica-100-mg-capsulas-moles-para-caes-9971>
- Direção Geral de Alimentação e Veterinária. 2024. Resumo das Características do Medicamento Veterinário - Cyclavance. <https://medvet.dgav.pt/products/772-01-14dfvpt-cyclavance-100-mg-ml-solucao-oral-para-caes-e-gatos-10121>
- Direção Geral de Alimentação e Veterinária, Confederação dos Agricultores de Portugal. 2021. Catálogo Oficial de Raças Autóctones Portuguesas. <https://www.dgav.pt/destaques/noticias/catalogo-oficial-de-racas-autoctones-portuguesas/>
- Drag M, Tielmans E, Mitchell E. 2022. Safety of oral afoxolaner formulated with or without milbemycin oxime in homozygous MDR1-deficient collie dogs. *J Vet Pharmacol Ther.* 45(4):373–379. doi: 10.1111/jvp.13064.
- Elmshäuser S, Straehle LC, Kranz J, Krebber R, Geyer J. 2015. Brain penetration of emodepside is increased in P-glycoprotein-deficient mice and leads to neurotoxicosis. *J Vet Pharmacol Ther.* 38(1):74–79. doi:10.1111/jvp.12149.
- EMRO. c2016. EM Products. Okinawa; [acedido em 2024 Out 10]. <https://www.emrojapan.com/products/>
- European Medicines Agency. 2021a. Resumo das Características do Medicamento Veterinário - Profender. <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/veterinary/EPAR/profender>
- European Medicines Agency. 2021b. Resumo das Características do Medicamento Veterinário - Procox. <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/veterinary/EPAR/procox>
- European Medicines Agency. 2021c. Resumo das Características do Medicamento Veterinário - Galliprant. <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/veterinary/EPAR/galliprant>
- European Medicines Agency. 2024a. Resumo das Características do Medicamento Veterinário - Stronghold. <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/veterinary/EPAR/stronghold>
- European Medicines Agency. 2024b. Resumo das Características do Medicamento Veterinário - Credelio plus. <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/veterinary/EPAR/credelio-plus>
- European Medicines Agency. 2024c. Resumo das Características do Medicamento Veterinário - Nexgard Spectra. <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/veterinary/EPAR/nexgard-spectra>
- European Medicines Agency. 2024d. Resumo das Características do Medicamento Veterinário - Simparica Trio. <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/veterinary/EPAR/simparica-trio>

- Fédération Cynologique Internationale. FCI Breeds Nomenclature. [acedido em 2024 Sep 18]. <https://www.fci.be/en/Nomenclature/>
- Finch A, Pillans P. 2014. P-glycoprotein and its role in drug-drug interactions. *Aust Prescr.* 37(4):137–139. doi:10.18773/austprescr.2014.050.
- Gaens D, Leithäuser C, Hamann M, Geyer J. 2019. Adverse Drug Reactions After Administration of Emodepside/Praziquantel (Profender®) in an MDR1-Mutant Australian Shepherd Dog: Case Report. *Front Vet Sci.* 6:461185. doi:10.3389/fvets.2019.00296.
- Gaens D, Rummel C, Schmidt M, Hamann M, Geyer J. 2019. Suspected neurological toxicity after oral application of fluralaner (Bravecto®) in a Kooikerhondje dog. *BMC Vet Res.* 15(1):1–5. doi:10.1186/S12917-019-2016-4.
- Galindo J, Ayala MA, Sánchez DR, Hernández C, Duifhuis T. 2021. Novel genotyping assay for the nt230 (del4) ABCB1 gene mutation and its allele frequency in Border Collie dogs in Mexico. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation.* 33(6):1133–1136. doi:10.1177/10406387211033839.
- Heit MC, Mealey KL, King SB. 2021. Tolerance and Pharmacokinetics of Galliprant™ Administered Orally to Collies Homozygous for MDR1-1Δ. *J Vet Pharmacol Ther.* 44(5):705–713. doi:10.1111/jvp.12984.
- Hugnet C, Bentjen SA, Mealey KL. 2004. Frequency of the mutant MDR1 allele associated with multidrug sensitivity in a sample of collies from France. *J Vet Pharmacol Ther.* 27(4):227–229. doi: 10.1111/j.1365-2885.2004.00585.x.
- Juliano RL, Ling V. 1976. A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes.* 455(1):152–162. doi:10.1016/0005-2736(76)90160-7.
- Kim Y, Chen J. 2018. Molecular structure of human P-glycoprotein in the ATP-bound, outward-facing conformation. *Science.* 359(6378), 915–919. doi:10.1126/science.aar7389
- Kitamura Y, Koto H, Matsuura S, Kawabata T, Tsuchiya H, Kusuhara H, Tsujimoto H, Sugiyama Y. 2008. Modest Effect of Impaired P-glycoprotein on the Plasma Concentrations of Fexofenadine, Quinidine, and Loperamide following Oral Administration in Collies. *Drug Metabolism and Disposition.* 36(5):807–810. doi:10.1124/dmd.107.017624.
- Koetsier G, Cantor E. 2024. A Practical Guide to Analyzing Nucleic Acid Concentration and Purity with Microvolume Spectrophotometers. <https://www.neb.com/en/application-notes>
- Krautmann MJ, Mahabir S, Fielder A, Collard W, Wolthuis TL, Esch K, Morton T, Alleman K, Luo L, McCandless E, et al. 2019. Safety of an extended-release injectable moxidectin suspension formulation (ProHeart® 12) in dogs. *Parasit Vectors.* 12(1):1–13. doi:10.1186/s13071-019-3690-6
- Kukanich B, Papich M. 2018. Opioid Analgesic Drugs. In: Riviere J, Papich M, editors. *Veterinary Pharmacology and Therapeutics.* 10th ed. John Wiley & Sons, Inc. p. 304.
- Li M, Abdurexit M, Xu Z, Gao Y, Zhang Y. 2024. Inhibitor of P-glycoprotein-mediated drug transport by curcumin in broiler chickens. *Am J Vet Res.* 85(5). doi:10.2460/ajvr.23.09.0210.
- Long WM, Sinnott VB, Bracker K, Thomas D. 2017. Use of 20% intravenous lipid emulsion for the treatment of loperamide toxicosis in a Collie homozygous for the ABCB1-1Δ mutation. *Journal of Veterinary Emergency and Critical Care.* 27(3):357–361. doi:10.1111/vec.12562.
- Mackin AJ, Riggs C, Beatty T, Mealey K, Boothe D, Archer T. 2020. Excessive Cyclosporine-Associated Immunosuppression in a Dog Heterozygous for the MDR1 (ABCB1-1Δ) Mutation. *J Am Anim Hosp Assoc.* 56(3):190–190. doi:10.5326/JAAHA-MS-7004.

- Marchetti S, Mazzanti R, Beijnen JH, Schellens JHM. 2007. Concise Review: Clinical Relevance of Drug–Drug and Herb–Drug Interactions Mediated by the ABC Transporter ABCB1 (MDR1, P-glycoprotein). *Oncologist*. 12(8):927–941. doi:10.1634/theoncologist.12-8-927.
- Martinez M, Modric S, Sharkey M, Troutman L, Walker L, Mealey K. 2008. The pharmacogenomics of P-glycoprotein and its role in veterinary medicine. *J Vet Pharmacol Ther*. 31(4):285–300. doi:10.1111/j.1365-2885.2008.00964.x.
- Mealey KL, Bentjen SA, Gay JM, Cantor GH. 2001. Ivermectin sensitivity in collies is associated with a deletion mutation of the *mdr1* gene. *Pharmacogenetics*. 11(8):727–733. doi:10.1097/00008571-200111000-00012.
- Mealey KL, Bentjen SA, Waiting DK. 2002. Frequency of the mutant MDR1 allele associated with ivermectin sensitivity in a sample population of Collies from the northwestern United States. *Am J Vet Res*. 63(4):479–481. doi:10.2460/ajvr.2002.63.479.
- Mealey KL, Clarke D. 2016. Ivermectin/Milbemycin/Moxidectin. In: Brutlag A, editor. *Blackwell's Five-Minute Veterinary Consult Clinical Companion, Small Animal Toxicology*. Second. John Wiley & Sons, Inc. p. 374–384.
- Mealey KL, Dassanayake S, Burke NS. 2017. Establishment of a cell line for assessing drugs as canine P-glycoprotein substrates: proof of principle. *J Vet Pharmacol Ther*. 40(5):545–551. doi:10.1111/jvp.12390.
- Mealey KL, Fidel J. 2015. P-Glycoprotein Mediated Drug Interactions in Animals and Humans with Cancer. *J Vet Intern Med*. 29(1):1–6. doi:10.1111/jvim.12525.
- Mealey KL, Fidel J, Gay JM, Impellizeri JA, Clifford CA, Bergman PJ. 2008. ABCB1-1Δ Polymorphism Can Predict Hematologic Toxicity in Dogs Treated with Vincristine. *J Vet Intern Med*. 22(4):996–1000. doi:10.1111/j.1939-1676.2008.0122.x.
- Mealey KL, Greene S, Bagley R, Gay J, Tucker R, Gavin P, Schmidt K, Nelson F. 2008. P-Glycoprotein Contributes to the Blood-Brain, but Not Blood-Cerebrospinal Fluid, Barrier in a Spontaneous Canine P-Glycoprotein Knockout Model. *Drug Metabolism and Disposition*. 36(6):1073–1079. doi:10.1124/dmd.107.018978.
- Mealey KL, Owens JG, Freeman E. 2023. Canine and feline P-glycoprotein deficiency: What we know and where we need to go. *J Vet Pharmacol Ther*. 46(1):1–16. doi:10.1111/jvp.13102
- Mealey KL, Waiting D, Raunig DL, Schmidt KR, Nelson FR, Schmidt DL, Nelson KR, Oral FR, Mealey KL. 2010. Oral bioavailability of P-glycoprotein substrate drugs do not differ between ABCB1-1Δ and ABCB1 wild type dogs. *J Vet Pharmacol Ther*. 33(5):453–460. doi:10.1111/j.1365-2885.2010.01170.x.
- Mizoi K, Okada R, Mashimo A, Masuda N, Itoh M, Ishida S, Yamazaki D, Ogihara T. 2024. Novel Screening System for Biliary Excretion of Drugs Using Human Cholangiocyte Organoid Monolayers with Directional Drug Transport. *Biol Pharm Bull*. 47(2):427–433. doi:10.1248/bpb.b23-00655
- Myers MJ, Martinez M, Li F, Howard K, Yancy HF, Troutman L, Sharkey M. 2018. Impact of ABCB1 genotype in Collies on the pharmacokinetics of R- and S-fexofenadine. *J Vet Pharmacol Ther*. 41(6):805–814. doi:10.1111/jvp.12696.
- Neff MW, Robertson KR, Wong AK, Safra N, Broman KW, Slatkin M, Mealey KL, Pedersen NC. 2004. Breed distribution and history of canine *mdr1*-1Δ a pharmacogenetic mutation that marks the emergence of breeds from the collie lineage. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 101(32):11725–11730. doi:10.1073/pnas.0402374101
- Nelson D, Cox M. 2021. *Lehninger Principles of Biochemistry*. 8th ed. Macmillan Learning.

- Papich M. 2018. Drugs for Treating Gastrointestinal Diseases. In: Riviere J, Papich M, editors. *Veterinary Pharmacology and Therapeutics*. 10th ed. John Wiley & Sons, Inc. p. 1264.
- Paul AJ, Hutchens DE, Firkins LD, Borgstrom M. 2004. Dermal safety study with imidacloprid/moxidectin topical solution in the ivermectin-sensitive collie. *Vet Parasitol*. 121(3–4):285–291. doi: 10.1016/j.vetpar.2004.03.005.
- Paul AJ, Tranquilli WJ, Hutchens DE. 2000. Safety of moxidectin in avermectin-sensitive Collies. *Am J Vet Res*. 61(5):482–483. doi:10.2460/ajvr.2000.61.482.
- Pires AE, Amorim IR, Ginja C, Gomes M, Godinho I, Simões F, Oom M, Petrucci-Fonseca F, Matos J, Bruford MW. 2009. Molecular structure in peripheral dog breeds: Portuguese native breeds as a case study. *Anim Genet*. 40(4):383–392. doi:10.1111/j.1365-2052.2009.01849.x.
- Posner L. 2018. Sedatives and Tranquilizers. In: Riviere J, Papich M, editors. *Veterinary Pharmacology and Therapeutics*. 10th ed. John Wiley & Sons, Inc. p. 324–328.
- Pulliam J, Seward R, Henry R, Steinberg S. 1985. Investigating ivermectin toxicity in Collies. *Vet Med*. 80(6):36–40.
- Schinkel AH, Smit JJM, van Tellingen O, Beijnen JH, Wagenaar E, van Deemter L, Mol CAAM, van der Valk MA, Robanus-Maandag EC, te Riele HPJ, et al. 1994. Disruption of the mouse *mdr1a* P-glycoprotein gene leads to a deficiency in the blood-brain barrier and to increased sensitivity to drugs. *Cell*. 77(4):491–502. doi:10.1016/0092-8674(94)90212-7.
- Sherman JG, Paul AJ, Firkins LD. 2010. Evaluation of the safety of spinosad and milbemycin 5-oxime orally administered to Collies with the MDR1 gene mutation. *Am J Vet Res*. 71(1):115–119. doi:10.2460/ajvr.71.1.115.
- Sisodiya SM, Martinian L, Scheffer GL, Van Der Valk P, Scheper RJ, Harding BN, Thom M. 2006. Vascular colocalization of P-glycoprotein, multidrug-resistance associated protein 1, breast cancer resistance protein and major vault protein in human epileptogenic pathologies. *Neuropathol Appl Neurobiol*. 32(1):51–63. doi:10.1111/j.1365-2990.2005.00699.x.
- Soussa RW, Woodward A, Marty M, Cannon CM. 2020. Breed is associated with the ABCB1-1Δ mutation in Australian dogs. *Aust Vet J*. 98(3):79–83. doi:10.1111/avj.12896.
- Stiedl CP, Weber K. 2017. Fast and simple detection methods for the 4–base pair deletion of canine MDR1/ABCB1 gene by PCR and isothermal amplification. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*. 29(2):176–180. doi:10.1177/1040638716683213.
- Sulik M, Antoszczak M, Huczyński A, Steverding D. 2023. Antiparasitic activity of ivermectin: Four decades of research into a “wonder drug.” *Eur J Med Chem*. 261:115838. doi:10.1016/j.ejmech.2023.115838.
- Taskar KS, Yang X, Neuhoff S, Patel M, Yoshida K, Paine MF, Brouwer KLR, Chu X, Sugiyama Y, Cook J, et al. 2022. Clinical Relevance of Hepatic and Renal P-gp/BCRP Inhibition of Drugs: An International Transporter Consortium Perspective. *Clin Pharmacol Ther*. 112(3):573–592. doi:10.1002/cpt.2670.
- Thonghin N, Collins RF, Barbieri A, Shafi T, Siebert A, Ford RC. 2018. Novel features in the structure of P-glycoprotein (ABCB1) in the post-hydrolytic state as determined at 7.9 Å resolution. *BMC Struct Biol*. 18(1):1–11. doi:10.1186/s12900-018-0098-z.
- Walther FM, Paul AJ, Allan MJ, Roepke RK, Nuernberger MC. 2014. Safety of fluralaner, a novel systemic antiparasitic drug, in MDR1(-/-) Collies after oral administration. *Parasit Vectors*. 7(1). doi:10.1186/1756-3305-7-86.
- West CL, Mealey KL. 2007. Assessment of antiepileptic drugs as substrates for canine P-glycoprotein. *Am J Vet Res*. 68(10):1106–1110. doi:10.2460/ajvr.68.10.1106.

III. Anexos

Anexo 1. Estalão da raça Rafeiro do Alentejo

Classificação FCI: Grupo 2 – Cães de tipo Pinscher e Schnauzer, Molossóides, Cães de Montanha e Boieiros Suíços. Secção 2.2 – Molossóides, tipo Montanha. Sem prova de trabalho.

Altura e Peso: Altura ao Garrote: Machos de 66-74 cm. Fêmeas de 64-70 cm. Peso: Machos de 45-60 kg. Fêmeas de 35-50 kg.

Comportamento/Caráter: Excelente guarda das herdades e quintas. É igualmente útil para a proteção de rebanhos, sobretudo durante a noite, sendo pouco tolerante na defesa do território ou das propriedades que lhe são confiadas. A expressão é calma e confiante, nem agressivo, nem tímido.

Aspetto Geral: Cão de grande tamanho, possante, rústico, sóbrio e tranquilo. De perfil, a cabeça é ligeiramente convexa; o conjunto da estrutura é mais comprido do que alto (sublongilíneo).

Proporções Importantes: Retangular (sublongilíneo); sendo a altura ao garrote ligeiramente inferior ao comprimento do corpo. A relação largura/comprimento do crânio deve ser 1/2. A relação comprimento do chanfro/comprimento do crânio deve ser 2/3. A altura do peito deve ser ligeiramente menor do que metade da altura ao garrote. Excelente guarda das herdades e quintas. É igualmente útil para a proteção de rebanhos, sobretudo durante a noite, sendo pouco tolerante na defesa do território ou das propriedades que lhe são confiadas. A expressão é calma e confiante, nem agressivo, nem tímido.

Cabeça: Volumosa, quase maciça, proporcionada ao seu tamanho; larga na parte posterior do crânio, mais estreita e menos convexa na frente. Os eixos superiores crânio faciais moderadamente divergentes.

Região Craniana: Crânio: Largo; abaulado nos dois eixos; arcadas supraciliares não salientes; sulco frontal pouco pronunciado entre e acima dos olhos; protuberância occipital pouco marcada; as faces laterais são bem musculadas. Stop: Pouco pronunciado.

Região Facial: Trufa: Oval, com a extremidade ligeiramente truncada de cima para baixo e de diante para trás; narinas bem abertas de cor preta. Chanfro: Direito, com corte transversal abaulado. A base é larga e alta, estreitando moderadamente até à extremidade; o chanfro é mais curto que o crânio. Lábios: Pretos, ligeiramente arredondados à frente, sobrepostos, bem rasgados; espessura média; de perfil inferior ligeiramente curvo. Maxilas/dentes: Fortes e bem desenvolvidos; articulação em tesoura, sendo tolerada a articulação em pinça. Faces: Ligeiramente marcadas com região masseterina saliente. Olhos: Pequenos; de forma elíptica, à flor da pele, castanhos (de preferência escuros). Pálpebras de pigmentação escura, firmes e acompanhando a forma do globo ocular. Expressão calma. Orelhas: Colocadas a média altura, pouco móveis, pequenas, dobradas e pendentes. A base é estreita; o comprimento é igual ou ligeiramente superior à largura. Triangulares e arredondadas na extremidade. Quando o cão está atento, as orelhas ficam dobradas, mantêm-se direitas na base e as dobras tornam-se mais marcadas no sentido longitudinal.

Pescoço: Boa saída de pescoço; direito; curto; forte; com uma só barbela (simples) de espessura regular e em proporção com o tamanho do cão.

Tronco: Possante; bem musculado, o comprimento é ligeiramente superior à altura ao garrote, volumoso. Linha Superior: Direita, quase horizontal, tolerando-se uma ligeira inclinação da frente para trás. Garrote: Pouco saliente, bem ligado ao pescoço. Dorso: Ligeiramente mergulhante, quase horizontal. Lombo/Rim: De comprimento médio; direito e largo; bem musculado. Garupa: Ligeiramente descida; de comprimento médio; larga e musculada, em proporção à corpulência. Peito: Largo; bem descido, à altura do cotovelo ou

ligeiramente abaixo. Peitoral: Largo, muito pouco marcado. Costelas: Bem arqueadas; ligeiramente inclinadas para trás. Linha Inferior e ventre: O esterno é quase horizontal; o ventre não é arregaçado, e prolonga a linha do esterno.

Cauda: De inserção média no prolongamento da garupa; espessa na base, pode ser ligeiramente encurvada ou voltada na extremidade, mas não quebrada; comprida. Em repouso, cai pelo menos até ao jarrete, de preferência um pouco abaixo; quando em ação pode levantar e enrolar sem se apoiar na linha superior.

Membros Anteriores: Fortes, afastados, bem aprumados de frente e de lado. Ombros: Fortes; de comprimento médio; bem desenvolvidos e musculados; angulação escapulo-umeral próxima dos 105°. Braços: Fortes; de comprimento médio; inclinados e musculados. Cotovelos: Encostados ao tórax, nem virados para dentro nem para fora; angulação úmero-radial entre 130° e 135°. Antebraços: Verticais; compridos; fortes; bem musculados. Carpos: Espessos; com boa articulação. Metacarpos: De comprimento médio; espessos; ligeiramente inclinados. Mãos: Os dedos são grossos, fechados (não afastados) e ligeiramente encurvados (arredondados); unhas fortes, variando de cor conforme a pelagem; as almofadas são espessas e resistentes.

Membros Posteriores: Fortes; afastados; bem aprumados vistos de trás e de lado. Coxas: Compridas; largas; musculadas, mas sem exagero; angulação coxofemoral cerca de 105°. Joelhos: Articulações fortes; na linha do corpo sem desvios para fora; angulação femorotibial entre 125° e 130°. Pernas: Fortes; moderadamente inclinadas; de comprimento médio; bem musculadas. Tarsos: Fortes; secos, de altura média; com angulações tibiotársicas cerca de 140°. Metatarsos: Grossos, de comprimento e altura médios; muito ligeiramente inclinados; podem apresentar presnhos simples ou duplos. Pés: Idênticos às mãos.

Andamentos: Pesados, lentos, bamboleantes sem exagero.

Pele: Espessa, quase tensa; mucosas internas parcial ou totalmente pigmentadas de preto, sendo as externas totalmente pigmentadas.

Pelagem: Pelo curto ou preferencialmente de meio comprimento; espesso, liso e denso, regularmente distribuído até aos espaços interdigitais. De cor preta, lobeira, fulva ou amarela, tigradas ou não, sempre com marcas brancas; branca com marcas das cores precedentes.

Defeitos Gerais: Qualquer desvio em relação ao estalão deve ser considerado como defeito e penalizado de acordo com a sua gravidade e das suas consequências na saúde e bem-estar do cão. Comportamento: Timidez. Aspetto geral: Má condição, magreza ou obesidade. Chanfro: Comprido, estreito, de perfil ligeiramente curvo ou truncado verticalmente. Linha dorsal: Encarpada ou enyelada. Garupa: Comprida, muito descaída, estreita. Cauda: Inserção muito alta ou muito baixa. Membros: Jarretes fechados; muito aberto de frente; angulação incorreta e falta de verticalidade dos tarsos. Pés: Não proporcionados ao tamanho, planos ou pés de lebre. Pelagem: Em más condições; pelo comprido, cerdoso ou ondulado.

Defeitos Graves: Aspetto Geral: Construção ligeira ou linfática. Cabeça: Não proporcionada ao tamanho, falta de volume, stop pronunciado, crânio plano e estreito, eixos craniofaciais paralelos. Olhos: Claros, não elípticos, inclinados; os bordos das pálpebras não acompanhando o globo ocular. Orelhas: Grandes, arredondadas, não dobradas, não caídas, parcialmente cortadas. Pescoço: Ausência de barbela, barbela demasiado preeguada ou dupla. Peito: Estreito e costelas planas. Cauda: Enrolada em repouso, gancho na extremidade, curta, cortada. Mucosas: Despigmentação parcial da parte externa da boca, das pálpebras, dos lábios e do nariz. Tamanho: Machos – menos de 66 cm ou mais de 75 cm. Fêmeas – menos de 64 cm ou mais de 71 cm.

Defeitos Eliminatorios (Desqualificações): Comportamento: Agressivo ou medroso. Tipo: Atípico. Aspetto Geral: Construção muito ligeira ou muito linfática. Cabeça: Muito estreita e comprida. Chanfro: Muito comprido; de perfil convexo. Maxilas: Prognatismo superior ou inferior. Crânio: Muito estreito. Olhos: Demasiado claros, de tamanho e cor diferentes. Orelhas: Muito mal implantadas, excessivamente grandes e redondas. Cauda: Anuros. Mucosas: Despigmentação total (albinismo), da boca, dos lábios e do nariz. Pelo: Muito curto.

Todo o cão que apresentar, de forma evidente, anomalias de ordem física ou comportamental deve ser desqualificado. Os machos devem apresentar os dois testículos, de aparência normal, bem descidos no escroto.

Anexo 2. Questionário (exemplo de participação com 1 cão)

SECÇÃO 1

Pergunta 1.1

Indique o seu nome completo:

Pergunta 1.2

Indique o seu endereço de e-mail:

Pergunta 1.3

Indique o seu contacto telefónico:

SECÇÃO 2

Pergunta 2.1

Qual a raça do(s) seu(s) cão/cães?

Barbado da Terceira



Pastor Alemão



Pastor de Shetland



Bobtail



Pastor Australiano



Rafeiro do Alentejo



Pergunta 2.2

Com quantos cães é que participou neste estudo?

	1
	2
	3
	4

SECÇÃO 3**Pergunta 3.1**

Qual o nome do seu cão?

Pergunta 3.2

Sexo:

	Macho
	Fêmea

Pergunta 3.3

Qual a idade do seu cão?

	<1 ano
	1-2 anos
	3-8 anos
	9-12 anos
	>12 anos

Pergunta 3.4

O seu cão já realizou algum teste genético para despiste da mutação MDR1?

	Sim
	Não

Pergunta 3.5

Se sim, qual foi o resultado do teste?

Pergunta 3.6

O seu cão é desparasitado para parasitas internos e/ou parasitas externos?

<input type="checkbox"/>	Sim
<input type="checkbox"/>	Não

Pergunta 3.7

Se sim, qual o(s) medicamento(s) que utiliza?

Pode selecionar mais que 1 opção. Se não for nenhuma das mencionadas, por favor escreva o(s) nome(s) na opção "outra"

<input type="checkbox"/>	Emodepside (Profender/Procox)
<input type="checkbox"/>	Ivermectina (Heartgard)
<input type="checkbox"/>	Milbemicina Oxima (Nexgard/Milbactor/Milbemax/Credelio/Milbeguard/Milpro/Milbenin/Mektix/ Amcofen/Milprazon/Alpramil)
<input type="checkbox"/>	Moxidectina (Simparica/Prinocate/Afilaria/Guardian/Advocate/Prinovox)
<input type="checkbox"/>	Selamectina (Stronghold/Evicto/Selames/Selehold)
<input type="checkbox"/>	Outra

Pergunta 3.8

Alguma vez observou algum tipo de reação adversa/efeito secundário após a desparasitação?

<input type="checkbox"/>	Sim
<input type="checkbox"/>	Não

Pergunta 3.9

Se sim, por favor descreva a reação:

Pergunta 3.10

Para além disso, o seu cão alguma vez reagiu negativamente a outros medicamentos?

<input type="checkbox"/>	Sim
<input type="checkbox"/>	Não

Pergunta 3.11

Se sim, a qual(ais) do(s) seguintes?

Pode selecionar mais que 1 opção. Se não for nenhuma das mencionadas, por favor escreva o(s) nome(s) na opção "outra"

	Acepromazina (Calmivet/SEDAN/Tranquigel/Temprace/Vetranquil)
	Apomorfina (Emedog/Apovomin)
	Butorfanol (Torphasol/Torbugesic/Butomidor/Alvegesic/Dolorex/Torphadine)
	Ciclosporina (Cyclavance/Sporimune/Atopica/Modulis)
	Doxorrubicina
	Grapiprant (Galliprant)
	Loperamida
	Maropitant (Cerenia/Vominil/Prevomax/Vetemex)
	Vincristina
	Outra

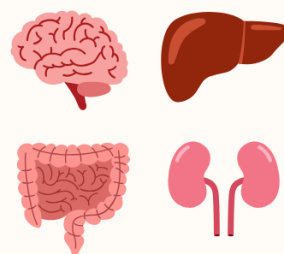
Pergunta 3.12

Se sim, por favor descreva a reação:

MUTAÇÃO NO GENE MDR1

O que é?

A mutação no gene MDR1 resulta num funcionamento anormal da glicoproteína P. Esta proteína é responsável pelo transporte de alguns fármacos e está presente em vários tecidos de inúmeros mamíferos, tais como os capilares cerebrais, canalículos biliares, mucosa intestinal e túbulos renais. Os animais afetados, quando tratados com alguns fármacos, podem exibir reações adversas que podem manifestar-se por sinais neurológicos, sinais gastrointestinais, sinais hematológicos e pode mesmo sobrevir a morte.



Que fármacos podem causar estas alterações?



- Desparasitantes (emodepside, ivermectina, milbemicina oxima, moxidectina e selamectina)
- Analgésicos (butorfanol, grapiprant)
- Quimioterápicos (doxorrubicina, vincristina)
- Indutor do vômito (apomorfina)
- Inibidor do vômito (maropitant)
- Sedativos (acepromazina)
- Imunomoduladores (ciclosporina)
- Opióides (loperamida)



Que raças são afetadas por esta mutação?



- Collie (70%)
- Whippet de pelo comprido (65%)
- Pastor Australiano (50%)
- McNab (30%)
- Pastor Inglês (15%)
- Pastor de Shetland (15%)
- Pastor Alemão (10%)
- Bobtail (5%)
- Border Collie (<5%)

Cuidados a ter

Todos os animais das raças mencionadas devem ser testados para avaliar se apresentam a mutação. Caso a apresentem, esses animais não devem ser utilizados em programas de reprodução de modo a não perpetuar a mutação na descendência. Se o seu animal possuir a mutação, isso deve ser do conhecimento do Médico Veterinário assistente de modo a que este possa fazer um aconselhamento do plano de desparasitação adequado e possa ponderar a utilização dos fármacos acima mencionados.



Miguel Monteiro Pinto