



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS

Marcela Custódio Scherr

**FREQUÊNCIAS DOS POLIMORFISMOS *CYP1A2* C1117T
E *GSTA3* I71L, RELACIONADOS AO METABOLISMO DE
XENOBIÓTICOS, EM CÃES DE RAÇA E SEM RAÇA DEFINIDA**

Orientadora: Prof^a Dr^a Carmen Silvia Passos Lima

Campinas

2010

Marcela Custódio Scherr

**FREQUÊNCIAS DOS POLIMORFISMOS *CYP1A2* C1117T
E *GSTA3* I71L, RELACIONADOS AO METABOLISMO DE XENOBIÓTICOS, EM
CÃES DE RAÇA E SEM RAÇA DEFINIDA**

Programa de Pós-Graduação
Fisiopatologia Médica
Faculdade de Ciências Médicas
Universidade Estadual de Campinas

Orientadora: Prof^a Dr^a Carmen Silvia Passos Lima

**Campinas
UNICAMP
2010**

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS DA UNICAMP**

Bibliotecário: Sandra Lúcia Pereira – CRB-8ª / 6044

Sc28f Scherr, Marcela Custódio
 Frequências dos polimorfismos CYP1A2 C1117T e GSTA3 I71L,
relacionados ao metabolismo de xenobióticos, em cães de raça e sem
raça definida / Marcela Custódio Scherr. Campinas, SP : [s.n.],
2010.

Orientador : Carmen Silvia Passos Lima
Dissertação (Mestrado) Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Ciências Médicas.

1. Polimorfismo. 2. Metabolismo. I. Lima, Carmen Silvia
Passos. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de
Ciências Médicas. III. Título.

Título em inglês: Frequency of polymorphisms CYP1A2 C1117T and GSTA3 I71L, related to metabolism of xenobiotics, in dogs of different breeds and mixed breed

Keywords: • Polymorphism
 • Metabolism

Titulação: Mestre em Fisiopatologia Médica

Área de concentração: Biologia Estrutural, Celular, Molecular e do Desenvolvimento

Banca examinadora:

Prof^ª. Dr^ª. Carmen Silvia Passos Lima

Prof^º. Dr^º. Mirela Tinucci Costa

Prof. Dr. José Vassalo

Data da defesa: 16-03-2010

Banca examinadora de Dissertação de Mestrado

Marcela Custódio

Orientadora(a): Prof(a). Dr(a). Carmen Silvia Passos Lima

Membros:	
Professor(a) Doutor(a) Carmen Silvia Passos Lima	
Professor(a) Doutor(a) Mirela Tinucci Costa	
Professor(a) Doutor(a) José Vassalo	

Curso de pós-graduação em Fisiopatologia Médica da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

Data: 18/03/2010

DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho à minha orientadora, Prof^a Dr^a Carmen, e agradeço pela confiança, paciência, ensinamentos repassados, e pela dedicação, que transcendeu em muito as exigências de seu papel e sua responsabilidade.

AGRADECIMENTOS

Ao **Prof. Dr. Fernando Ferreira Costa**, pelo apoio através da cessão de materiais e do laboratório, essenciais para o desenvolvimento desse projeto.

À **Dulcinéia M. Albuquerque** e ao **Anderson Cunha**, do Hemocentro, pela enorme ajuda na elaboração do projeto e no processamento do material.

À **Profa. Carmen Bertuzzo** e à **Luciana Bonadia**, do Departamento de Genética Médica, pela ajuda na resolução de problemas relacionados à metodologia; a ajuda de vocês foi imprescindível para a realização deste trabalho.

À estatística **Cleide**, pela paciência e dedicação nas análises dos dados referentes aos nossos resultados.

À **Cristiane**, ao **Anderson Zanetti**, à **Érika**, ao **Eliel** e, principalmente, ao **Gustavo**, do Laboratório de Genética do Câncer, pela ajuda e amizade inestimáveis, fundamentais no desenvolvimento da parte prática do meu trabalho.

Às queridas **Manoela** e **Helvia** que, mesmo longe, ajudaram muito, principalmente na elaboração da parte final.

Às minhas amadas irmãs, **Melina** e **Gabriela**, por me acompanharem todos os dias ao longo desta longa caminhada me ajudando de todas as maneiras possíveis, meus sinceros agradecimentos; sem vocês nada seria possível e nem faria sentido.

Aos **meus pais**, por me ampararem incondicionalmente.

Ao meu querido marido **Adolfo**, pela paciência, amor incondicional e companheirismo, que me deram força para ir até o final.

Aos meus **amigos**, pela compreensão, pela amizade e pela torcida.

E, principalmente, a **Deus**, por me proteger e estar constantemente ao meu lado.

E faço um agradecimento especial aos cães que fizeram parte de minha vida e ajudaram a lhe dar forma, e aos inumeráveis cães que eu encontrei ao longo do meu trabalho e que

tocaram a minha alma e me inspiraram. Obrigada por suas indescritíveis dádivas à humanidade!

Os cães nos mostram, a cada dia em que convivemos com eles, inúmeras virtudes, como amor incondicional, benevolente, misericordioso, paciente e sempre disposto a perdoar. E a lealdade e devoção caninas nos ensinam diariamente, através do exemplo, o que significa amar incondicionalmente.

Talvez, se pedirmos, eles nos ensinem a ser assim também!

Muito obrigada a todos vocês!

EPÍGRAFE

“Haverá um dia em que o homem conhecerá o íntimo dos animais e, nesse dia, um crime praticado contra um animal será considerado um crime contra a humanidade.”

Leonardo da Vinci

**A realização deste estudo contou com o apoio da Fundação de Amparo à Pesquisa
do Estado de São Paulo (FAPESP)**

Processo nº 08/52526-8 e Processo nº 56289-0

SUMÁRIO

DEDICATÓRIA	vii
AGRADECIMENTOS.....	ix
EPÍGRAFE.....	xiii
SUMÁRIO	xvii
LISTA DE ABREVIATURAS	xxi
LISTA DE FIGURAS.....	xxiii
LISTA DE TABELAS.....	xxv
RESUMO	xxix
ABSTRACT.....	xxx
INTRODUÇÃO.....	33
1. Cães como modelos de descoberta de fármacos	35
2. Cães como modelos de tumores.....	36
3. Aspectos genéticos no metabolismo de fármacos e carcinógenos.....	39
3.1. Enzimas do citocromo P450.....	39
3.2. Enzimas glutatona S-transferases.....	43
OBJETIVOS.....	47
CASUÍSTICA E MÉTODOS.....	51
1. Avaliação clínica.....	53
2. Análise molecular dos genes <i>CYP1A2</i> e <i>GSTA3</i>	58
2.1. Extração do DNA a partir dos leucócitos.....	58
2.2. Identificação dos genótipos do polimorfismo C1117T do gene <i>CYP1A2</i>	58
2.3. Identificação dos genótipos do polimorfismo I71L do gene <i>GSTA3</i>	61

3.	Aspectos éticos	62
4.	Análise estatística	62
	RESULTADOS	63
1.	Avaliação clínica.....	65
2.	Análise molecular dos genes <i>CYP1A2</i> e <i>GSTA3</i>	66
2.1.	Polimorfismos gênicos em animais de diferentes raças.....	66
2.2.	Polimorfismos gênicos e aspectos clínicos	74
	DISCUSSÃO.....	79
	CONCLUSÕES.....	93
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	97
	ANEXOS.....	117

LISTA DE ABREVIATURAS

μL	Microlitro
AA	Aminas aromáticas
CYPs	Enzimas do citocromo P450
C1117T	Polimorfismo do gene <i>CYP1A2</i>
<i>CYP1A2</i>	Gene citocromo P450 1A2
dNTP	Desoxiribonucleotídeo
DP	Desvio padrão
G	Gramma
HAPs	Hidrocarbonetos aromáticos policíclicos
HCl	Ácido clorídrico
I71L	Polimorfismo do gene <i>GSTA3</i>
IC	Intervalo de confiança
mg	Miligrama
MgCl₂	Cloreto de magnésio
ml	Mililitro
mM	Milimolar
NaCl	Cloreto de sódio
OR	Razão das chances
pb	Pares de bases
PCR	Reação em cadeia da polimerase
rpm	Rotações por minuto
SDS	Sódio dodecil sulfato
<i>GSTA3</i>	Gene glutathiona S-transferase A3

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Cão da raça boxer	51
Figura 2. Cão da raça rottweiler	51
Figura 3. Cão da raça pastor alemão	52
Figura 4. Cão sem raça definida	52
Figura 5. Escore corporal de cães de acordo com a gordura	53
Figura 6. Fragmentos obtidos do éxon 4 do gene <i>CYP1A2</i> de cães, amplificados por meio da reação em cadeia da polimerase em gel de agarose	63
Figura 7. Genótipos do polimorfismo <i>CYP1A2</i> I71L de cães em esferograma de sequenciamento automatizado	64
Figura 8. Fragmentos obtidos do éxon 4 do gene <i>GSTA3</i> de cães, amplificados por meio da reação em cadeia da polimerase em gel de agarose	65
Figura 9. Genótipos do polimorfismo <i>GSTA3</i> I71L de cães em gel de agarose	66

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1. Frequências dos genótipos distintos e alélica do polimorfismo <i>CYP1A2</i> C1117T em cães da raça beagle	37
Tabela 2. Frequências dos genótipos distintos e do alelo variante do polimorfismo <i>GSTA3</i> I71L em humanos de diferentes etnias	41
Tabela 3. Distribuições dos 398 cães inseridos no estudo de acordo com a raça, o sexo, a idade e a condição corporal	61
Tabela 4. Frequências dos genótipos do polimorfismo <i>CYP1A1</i> C1117T em cães de diferentes raças e cães sem raça definida	67
Tabela 5. Frequências dos genótipos do polimorfismo <i>CYP1A2</i> C1117T em cães de diferentes raças e cães sem raça definida	68
Tabela 6. Frequências dos genótipos do polimorfismo <i>CYP1A2</i> C1117T entre cães de raças distintas e cães sem raça definida	69
Tabela 7. Frequências dos genótipos do polimorfismo <i>CYP1A2</i> C1117T em cães da raça boxer estratificados por aspectos clínicos	71
Tabela 8. Frequências dos genótipos do polimorfismo <i>CYP1A2</i> C1117T em cães da raça rottweiler estratificados por aspectos clínicos	72
Tabela 9. Frequências dos genótipos do polimorfismo <i>CYP1A2</i> C1117T em cães da raça pastor alemão estratificados por aspectos clínicos	73
Tabela 10. Comparações de frequências dos genótipos do polimorfismo <i>CYP1A2</i> C1117T em cães sem raça definida estratificados por aspectos clínicos	74

Tabela 11.	Importantes substratos metabolizados pela enzima CYP1A2 do sistema do citocromo P450	80
Tabela 12.	Substratos mais relevantes para a enzima GSTA3 do sistema da glutathiona S-transferase	88

RESUMO

A habilidade de metabolizar xenobióticos é variável em humanos e em cães e está relacionada a genótipos distintos de genes polimórficos. Os portadores do genótipo *CYP1A2* 1117TT foram classificados como metabolizadores lentos de fármacos. Ainda, os alelos variantes T e C dos polimorfismos *CYP1A2* C1117T e *GSTA3* I71L foram descritos como menos eficazes na ativação e inativação de carcinógenos do que os selvagens, respectivamente. Assim, humanos e cães podem apresentar diferentes respostas a medicamentos e estar sob riscos distintos de ocorrência de tumores. As frequências dos genótipos dos polimorfismos *CYP1A2* C1117T e *GSTA3* I71L em cães de diferentes raças e sem raça definida (SRD) não foram ainda descritas. O objetivo deste estudo foi o de identificar as frequências dos genótipos em 105 cães da raça boxer, 84 cães da raça rottweiler, 110 cães da raça pastor alemão e 99 animais SRD, para verificar se ocorre distribuição distinta de genótipos em animais de diferentes grupos. O genótipos foram identificados por amplificação das regiões gênicas de interesse, em amostras de sangue periférico, por meio da reação em cadeia da polimerase seguida por sequenciamento ou digestão enzimática dos fragmentos amplificados. A frequência do genótipo homozigoto selvagem CC do polimorfismo *CYP1A2* C1117T foi maior em cães de raça (96,4% versus 87,9%, $P= 0,002$) e boxers (98,0% versus 87,9%, $P= 0,005$) do que em cães SRD. Frequências genotípicas similares foram observadas em cães estratificados por aspectos clínicos. Apenas o genótipo variante CC do polimorfismo *GSTA3* I71L foi identificado em nossos cães. Nossos resultados sugerem que cães de raça metabolizam fármacos e ativam carcinógenos de forma mais eficaz do que cães SRD e podem obter maior benefício medicamentoso e estar sob risco maior de tumores. Já o metabolismo de xenobióticos pela enzima *GSTA3* parece similar em cães de diferentes raças e não influenciar diferentemente a resposta a medicamentos e o risco de tumores nesses animais.

ABSTRACT

The ability to metabolize xenobiotics is variable among humans and dogs, and is related to the distinct genotypes of polymorphic genes. Carriers of the *CYP1A2* 1117TT genotype were classified as poor metabolizers of drugs. In addition, the varying T and C alleles of *CYP1A2* C1117T e *GSTA3* I71L polymorphisms were described as less efficient in the activation and inactivation of carcinogens than the wild alleles, respectively. Thus, humans and dogs seem to obtain distinct benefits under drug treatments and also to be under different risks of tumours. The frequencies of genotypes of the referred genes in dogs of different breeds and mixed breed are yet not described. The objective of this study was to identify the frequencies of the genotypes in 105 boxers, 84 rottweilers, 110 german shepherds and 99 mixed breed dogs with the purpose of to verify if a distinct distribution of genotypes occurs in animals of different groups. The genotypes were evaluated by amplifying the area of interest of the genes, in peripheral blood samples, using a polymerase chain reaction followed by a sequencing or enzymatic digestion of the amplified fragments. The frequency of the homozygous wild CC genotype of the *CYP1A2* C1117 polymorphism was higher in dogs of pure breed (96,4% versus 87,9%, $P= 0.002$) and boxers (98.0% versus 87,9%, $P= 0.005$) than in mixed breed dogs. Similar frequencies of the genotypes were seem in dogs stratified by clinical features. Just the CC varying genotype of the *GSTA3* I71L polymorphism was identified in all dogs. The results of this study suggest that pure breed dogs might be more efficient in metabolizing drugs and in activating carcinogens than mixed breed dogs, and therefore, may obtain larger therapeutic benefits under treatment for diseases and may be under higher risk for tumors. In contrast, the metabolim of xenobiotics by the *GSTA3* enzyme seems to be similar among dogs of different breeds and not to influence on a different way the drug metabolism or tumour risk in these animals.

INTRODUÇÃO

Cães são animais de companhia para o homem por séculos e são vistos, em geral, como seus melhores amigos. Além deste papel fundamental para o bem estar de humanos, cães também servem como modelos para a descoberta de novos medicamentos e para a prevenção de câncer em humanos (UCHIDA *et al.*, 1990; WATERS & WILDASIN, 2006).

1. Cães como modelos de descoberta de fármacos

Cães são utilizados como modelos para a descoberta de novos medicamentos, em geral para humanos, por várias décadas. Este fato pode ser atribuído às semelhanças entre a anatomia e a fisiopatologia desses animais e de humanos, particularmente às dos sistemas cardiovascular, urogenital, nervoso e musculoesquelético (LINDBLAD-TOH *et al.*, 2005; KHANNA *et al.*, 2006; OLSON 2007; GORDON *et al.*, 2009). Assim, drogas experimentais com efeitos benéficos e toxicidade aceitável em cães podem ser utilizadas em estudos clínicos em humanos (GORDON *et al.*, 2009).

Numerosos anestésicos, antibióticos, anticonvulsivantes, anti-inflamatórios foram incorporados na rotina de tratamento de indivíduos com doenças variadas, com base em resultados de estudos farmacocinéticos realizados em cães (NASCIMENTO *et al.*, 1994; TASAKI *et al.*, 1998; GASPARINI *et al.*, 2007; LUNA *et al.*, 2007; PAES *et al.*, 2009; SOARES *et al.*, 2009).

Mais recentemente, cães foram também utilizados para a descoberta de novos quimioterápicos, bem como para a avaliação de seus efeitos tóxicos (KHANA *et al.*, 2002; HANSEN & KHANNA, 2004; KHANNA *et al.*, 2006; RUSK *et al.*, 2006; WATERS & WILDASIN, 2006; OLSON 2007), fornecendo subsídios para a condução de ensaios clínicos em humanos. Ainda, embora a maioria das terapias utilizadas para o tratamento do câncer de humanos seja menos eficaz para o tratamento do câncer de cães,

acredita-se que estudos farmacocinéticos de quimioterápicos conduzidos em cães possam contribuir para o tratamento oncológico de ambas espécies (LINDBLAD-TOH *et al.*, 2005; KHANNA *et al.*, 2006; WATERS & WILDASIN, 2006; OLSON, 2007).

2. Cães como modelos de tumores

Acredita-se que o câncer ocorra devido a anormalidades que conferem, a algumas células, vantagens que são transmitidas às células filhas, dando origem a um clone celular que escapa aos controles de crescimento e diferenciação (NAMBA *et al.*, 1990). Embora cerca de 350 bilhões de células se dividam no humano adulto normal todos os dias, o aparecimento de um tumor é relativamente raro, devido aos mecanismos fisiológicos de reparo do ácido desoxirribonucléico dos núcleos celulares (WARD, 1997).

O câncer é a segunda causa de óbito em humanos nos Estados Unidos, sendo superado apenas pelas doenças cardiovasculares (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2009). No Brasil figura como a terceira principal causa de óbito, sendo superado apenas pelas doenças cardiovasculares e causas externas, como os acidentes de trânsito e aquelas atribuídas à violência urbana (MINISTÉRIO DA SAÚDE DO BRASIL, 2009).

Em cães e gatos, o câncer é também a principal causa de óbito, nos EUA (WITHROW & MACEWEN, 2001; PAOLONI *et al.*, 2007). Cerca de 45% desses animais que vivem mais que dez anos morrem de câncer. A prevalência do câncer em animais de companhia aumenta a cada dia e é atribuída ao aumento do tempo de vida dos animais (WITHROW & MACEWEN, 2001). A maior exposição à carcinógenos ambientais constitui outra possível explicação para a alta prevalência atual de câncer nesses animais, pois compartilham o mesmo espaço que seus donos (WATERS & WILDASIN, 2006; GORDON *et al.*, 2009). Foi estimado por grupos de pesquisadores do Instituto Nacional do Câncer dos Estados Unidos da América que mais de 4 milhões de casos de câncer são

diagnosticados em cães a cada ano naquele país, o que torna a doença um importante problema para os animais e seus cuidadores (KHANNA *et al.*, 2006; WATERS & WILDASIN, 2006). Entretanto, a prevalência de câncer em cães no Brasil é desconhecida.

Os cânceres mais prevalentes em cães são o osteossarcoma, o linfoma, o hemangiossarcoma, o mastocitoma e o carcinoma de mama (WITHROW & MACEWEN, 2001; OLSON, 2007). Estas neoplasias apresentam alta similaridade com as respectivas neoplasias em humanos quanto à localização, à agressividade e aos mecanismos de metástase (WATERS & WILDASIN, 2006; OLSON, 2007). Ainda, os cães facilitam estudos de aspectos genéticos em câncer, como resultado das gestações, ninhadas múltiplas e estudos de associações de fatores ambientais, nutrientes e câncer, devido à menor expectativa de vida que os humanos (OLSON, 2007).

Cães de grande porte, como boxer, rottweiler e pastor alemão, apresentam maior prevalência de câncer como evento final de vida do que cães de outras raças (CRAIG, 2001; WITHROW & MACEWEN, 2001; PROSCHOWSKY *et al.*, 2003). Ainda, tipos distintos de câncer são mais prevalentes em cães de determinadas raças. Assim, mastocitoma e tumores cerebrais são comuns em boxers, osteossarcoma em rottweilers e hemangiossarcoma em cães da raça pastor alemão (BAKER-GABB *et al.*, 2003; SARGAN, 2007).

Em contraste, o câncer parece incomum em cães sem raça definida (SRD). De fato, não há citações sobre tumores ou tumores mais prevalentes nesse grupo de animais em livros (WITHROW & MACEWEN, 2001) ou literatura científica disponível à acesso de pesquisadores. Entretanto, a menor ocorrência de câncer em cães SRD é apenas uma inferência e deve ser vista como uma hipótese a ser investigada.

O padrão da dieta está definitivamente associado ao câncer. Em humanos, o consumo de carnes gordurosas e cozidas à altas temperaturas predis põem ao câncer. Já a ingestão de vegetais de cor verde escuro, amarela e laranja parece reduzir o risco de

ocorrência de neoplasias diversas em humanos (RIBOLI *et al.*, 1991; MICHAUD *et al.*, 2000) e aparentemente também em cães (RAGHAVAN *et al.*, 2005).

Estudos realizados por Pérez Alenza *et al.* (1998) e (2000) demonstraram que a incidência de tumor mamário e displasia mamária foi maior em cadelas alimentadas com alimentos caseiros que em cadelas alimentadas com ração, mas vale ressaltar que a dieta caseira fornecida foi rica em carne vermelha bovina e suína e pobre em carne de frango.

A obesidade também pode influenciar a ocorrência de tumores em humanos, como o carcinoma colorretal (WEI *et al.*, 2004; VANAMALA *et al.*, 2008), o adenocarcinoma de mama pós-menopausa (VAN DEN BRANDT *et al.*, 2000; SCHLIENGER *et al.*, 2009), o adenocarcinoma gastroesofágico (CREW *et al.*, 2004; FORMAN *et al.*, 2004; SCHLIENGER *et al.*, 2009) e o carcinoma hepatocelular (WANG *et al.*, 2004b; OSÓRIO-COSTA *et al.*, 2009). A associação entre obesidade e certos tipos de câncer, como o carcinoma e o adenocarcinoma mamário, o mastocitoma e o hemangiossarcoma, foi também observada em cães (WEETH *et al.*, 2007).

A exposição a carcinógenos ambientais, como hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HAPs) de tintas e solventes, pode determinar câncer, particularmente linfoma, em humanos e em cães (GAVAZZA *et al.*, 2001; GOLD *et al.*, 2001; MATHAROO-BALL *et al.*, 2008). Cães também são expostos a HAPs da fumaça do cigarro de seus donos fumantes ao longo dos anos de convívio comum e, assim, funcionam como tabagistas passivos (HOVELL & IRVIN, 2007; ROZA & VIEGAS, 2007), o que pode contribuir para a ocorrência do câncer de pulmão (BENFIELD & HAMMOND, 1992).

Ainda, foi recentemente descrita a relação entre fibrose pulmonar e câncer de pulmão em cães expostos de forma experimental ao plutônio (WILSON, 2009). Os resultados do estudo sugerem que medidas de proteção contra a radiação devem ser tomadas para aqueles que entram em contato com o mineral, para a prevenção das doenças pulmonares (WILSON, 2009).

3. Aspectos genéticos no metabolismo de fármacos e carcinógenos

O metabolismo de medicamentos e carcinógenos envolve enzimas de fase I, como as do citocromo P450, e as de fase II, como as glutatônicas S-transferases, em humanos e em cães (CONNEY, 1982; HAYES & PULFORD, 1995; NELSON *et al.*, 1996).

3.1. Enzimas do citocromo P450

A nomenclatura “citocromo P450” foi proposta como uma definição temporária porque os pigmentos contidos nas células apresentaram pico de Soret, ou seja, absorção de máxima de luz quando saturado por monóxido de carbono de 450 nanômetros. Mas, de fato são enzimas e não são citocromos verdadeiros. A denominação correta a elas atribuída é hemetilato. Entretanto, o termo enzimas dependentes do “citocromo P450” (CYPs) foi mantido na prática diária para designá-las monoxigenase (OMURA *et al.*, 1962; BACHSCHMID *et al.*, 2005).

As CYPs atuam no metabolismo de medicamentos, como anestésicos, antibióticos e antiinflamatórios (CRIBB *et al.*, 1995; BUTERS *et al.*, 2002; DANIELSON, 2002; WYNALDA *et al.*, 2003).

As enzimas inativam medicamentos ou ativam inúmeras pró drogas em substâncias terapeuticamente ativas (HIGUCHI & STELLA, 1975), uma vez que são responsáveis por 70-80% da fase I do metabolismo de xenobióticos (GUENGERICH, 2006; NEBERT & DALTON, 2006).

O gene *CYP1A2*, em cães, está localizado no cromossomo 30. Codifica enzima que atua no metabolismo do 5-(3-methoxyphenyl)-3-(5-methyl-1,2,4-oxadiazol-3-yl)-2,1,2-dihydro-[7-14C]-1,6-naphyridine (AC-3933), um agonista de benzodiazepínicos (MISE *et al.*, 2004a; MISE *et al.*, 2004b) e do 4-cyclohexyl-1-ethyl-7-methylpyrido [2,3-d]

pyrimidina-2-(1H)-um) (YM-64227), um inibidor fosfodiesterase tipo 4 com efeito antiinflamatório (MISE *et al.*, 2004a; TENMIZU *et al.*, 2004; TENMIZU *et al.*, 2006).

Concentrações séricas distintas destes medicamentos ou seus metabólitos foram observados em cães da raça beagle com os genótipos distintos do polimorfismo *CYP1A2* C1117T (PAULSON *et al.*, 1999; MISE *et al.*, 2003; MISE *et al.*, 2004; TENMIZU, 2004).

O polimorfismo *CYP1A2* C1117T consiste na troca de um nucleotídeo citosina por uma timina na posição 1117 do gene, que ao invés de codificar um aminoácido asparagina resulta na formação de um “stop códon”, que impede a produção da enzima (MISE *et al.*, 2004b). Cães com o genótipo homozigoto variante 1117TT foram considerados metabolizadores lentos dos medicamentos (TENMIZU *et al.*, 2004; TENMIZU *et al.*, 2006).

As freqüências dos genótipos e alelos do polimorfismo C1117T do gene *CYP1A2*, identificadas em cães da raça beagle por Mise *et al.* (2004), estão apresentadas na Tabela 1.

Tabela 1. Frequências dos genótipos distintos e alélica do polimorfismo CYP1A2 C1117T em cães da raça beagle

	Genótipo				Alelo	
	Total	CC	CT	TT	C	T
Número de cães	149	56	76	17	188	110
Frequência	100,0%	37,6%	51,0%	11,4%	63,1%	36,9%

C: alelo selvagem; T: alelo variante

MISE *et al.* (2004) verificou que cães da raça beagle apresentam genótipos distintos do gene. No entanto, não foram ainda estabelecidas as suas frequências em cães de raças distintas.

As CYPs também atuam no metabolismo de substâncias endógenas, como a testosterona, o estradiol e o estrógeno (KOBAYASHI *et al.*, 2000; WANG *et al.*, 2004a). Além disso, a maioria dos carcinógenos conhecidos é metabolizada por CYPs (DANIELSON, 2002) a espécies reativas com características eletrofilicas (GUENGERICH, 2001). As CYPs atuam no metabolismo de aminas aromáticas (AA) e HAPs de alimentos defumados e gordurosos grelhados na brasa (GOODHERHAM *et al.*, 1996; STECK & HEBERT, 2009) e de HAPs da exposição ambiental à gasolina, tiner, água ras, varsol, a gases de exaustão de veículos automotores, especialmente os movidos a diesel, e a produtos da combustão do tabaco e de indústrias petroquímica e siderúrgica (HECHT, 2002; ZANGER *et al.*, 2008).

Esses compostos estão diretamente relacionados à carcinogênese química. A confirmação inequívoca dos danos celulares por eles provocados surgiu na década de 1930, após ter sido verificado que cães e macacos desenvolveram neoplasias relacionadas a doses elevadas de 2-aminonaftaleno na dieta (HUEPER, 1938).

As AA podem ser metabolizadas a compostos e estes podem formar adutos, ou seja, ligações covalentes com centros nucleicos presentes em macromoléculas biológicas como o ácido desoxirribonucleico (DNA) ou o ácido ribonucleico (RNA), causando perturbações conformacionais em tais moléculas. Caso esse aductos com o DNA não forem reparados poderão causar mutações em genes críticos envolvidos no controle do ciclo celular ou supressão tumoral (MILLER, 1978; HECHT, 1999).

As CYPs ativam carcinógenos a substâncias ainda mais tóxicas (SPURR *et al.*, 1987; HAYES & PULFORD, 1995; HENGSTLER *et al.*, 1998; OSAWA *et al.*, 2007) que serão inativadas, posteriormente, por enzimas de fase II do metabolismo de xenobióticos (NYBERG *et al.*, 1998; DANIELSON, 2002; TETLOW *et al.*, 2004; OSAWA *et al.*, 2007).

Várias destas enzimas são codificadas por genes polimórficos em humanos, como o *CYP1A1*, o *GSTM1* e o *GSTT1* (ARRUDA *et al.*, 2001; VINEIS, 2004), cujas frequências dos genótipos distintos são variáveis em indivíduos de diferentes etnias (VINEIS *et al.*, 1999; NASCIMENTO *et al.*, 2003; TOWNSEND & TEW, 2003; TETLOW *et al.*, 2004; MCILWAIN *et al.*, 2006; YAMAGUTI *et al.*, 2009).

Genótipos específicos de genes polimórficos que codificam enzimas de fases I do metabolismo de carcinógenos foram associados a riscos aumentados de câncer, à maior agressividade da doença ou à sua ocorrência em idade mais precoce do que a preconizada em humanos de nossa população (ORTEGA *et al.*, 2003) e de outros países (DANIELSON, 2002; VINEIS, 2004).

Até onde atinge nosso conhecimento, não se encontra ainda estabelecido se o polimorfismo *CYP1A2* C1117T existe em humanos e quais são os papéis do gene na carcinogênese de humanos e de cães. Também não se conhecem as frequências do polimorfismo gênico em cães de diferentes raças e em cães SRD.

3.2. Enzimas glutaciona S-transferases

Os xenobióticos são inativados por enzimas de fase II, como as glutaciona S-transferases (GSTs), que fazem parte do mecanismo de proteção contra a carcinogênese química (KETTERER, 1988; HAYES & PULFORD, 1995; CHEN *et al.*, 1996; COTTON *et al.*, 2000; SLATTERY *et al.*, 2000; TOWNSEND & TEW, 2003). Essas enzimas catalisam a conjugação de moléculas eletrofílicas de carcinógenos à glutaciona reduzindo-os, quase sempre, a produtos menos tóxicos (CLAPPER *et al.*, 1991; MOORGHEN *et al.*, 1991; HAYES & PULFORD, 1995; CHEN *et al.*, 1996; ZHANG *et al.*, 1999; JOSEPHY *et al.*, 2006).

As GSTs inativam ou tornam menos tóxicas várias substâncias endógenas, como os hormônios esteróides (JOHANSSON & MANNERVICIK, 2001), e exógenas, como as AA e os HAPs de alimentos gordurosos grelhados na brasa (VERHOEVEN *et al.*, 1997) e os HAPs da exposição ambiental (SLATTERY *et al.*, 2000; WENZLAFF *et al.*, 2005).

Seis classes de genes codificadores destas proteínas foram identificados em humanos: alpha, mu, pi, sigma e theta e a zeta (HAYES & PULFORD, 1995; TOWNSEND & TEW, 2003). Vários desses genes são polimórficos, como o *GSTA1* (COLES *et al.*, 2001), o *GSTA2* (NING *et al.*, 2004) e o *GSTA3* (TETLOW *et al.*, 2004) da classe alpha, o *GSTM1* (SEIDEGARD *et al.*, 1988; OSAWA *et al.*, 2007) e o *GSTM3* (INSKIP *et al.*, 1995) da classe mu, o *GSTP1* da classe pi (ALI-OSMAN *et al.*, 1997), o *GSTT1* da classe teta (PEMBLE *et al.*, 1994) e o *GSTZ1* da classe zeta (BLACKBURN *et al.*, 2000).

A classe alfa das glutionas S-transferases em humanos é composta por cinco genes, *GSTA1* a *GSTA5*, que parecem envolvidos na suscetibilidade a doenças como asma, distúrbios cardiovasculares e câncer (COLES & KADLUBAR, 2005). Os genes das classes alfa1 e alfa2 catalizam a conjugação de uma ampla gama de eletrófilos, possuem atividade esteróide isomerase dependente e atividade peroxidase glutationa dependente. Já os genes das classes alfa 3 e alfa 4 participam também do metabolismo de carcinógenos ambientais (COLES & KADLUBAR, 2005).

As GSTs da classe alfa estão amplamente expressas em tecidos humanos, sendo que as *GSTA3* estão presentes particularmente em tecidos com atividade estereoidogênica como placenta, ovários, testículos e glândula adrenal e tecidos como o pulmão, o estômago e a traquéia (MOREL *et al.*, 1994; JOHANSSON & MANNERVICIK, 2001; MOREL *et al.*, 2002).

Os alelos selvagens e variantes dos genes *GSTA1*, *GSTA2* e *GSTA3*, da classe alpha, codificam quantidades distintas das enzimas ou enzimas com capacidades funcionais diferentes (COLES *et al.*, 2001; TOWNSEND & TEW, 2003; NING *et al.*, 2004; TETLOW *et al.*, 2004; YOSHIDA *et al.*, 2007).

O polimorfismo I71L do gene *GSTA3*, em humanos, consiste na troca de um nucleotídeo adenina por um nucleotídeo citosina, com a consequente substituição de uma isoleucina por uma leucina na proteína codificada. O polimorfismo determina a síntese de isoenzimas com função variável na detoxificação de carcinógenos, sendo que o alelo selvagem A é mais eficaz do que o alelo variante C na atividade esteróide isomerase. Assim, os genótipos distintos do polimorfismo *GSTA3* I71L podem ter impacto direto ou indireto em doenças determinadas por estresse oxidativo em tecido estereoidogênico (TETLOW *et al.*, 2004).

As freqüências dos genótipos distintos e do alelo variante C do polimorfismo *GSTA3* I71L em humanos de diferentes populações étnicas (TETLOW *et al.*, 2004) estão apresentadas na Tabela 2.

Tabela 2. Freqüências dos genótipos distintos e do alelo variante C do polimorfismo *GSTA3* I71L em humanos de diferentes etnias

Etnias	N	Genótipos I71L em números (%)			Alelo variante C
		AA	AC	CC	(Frequência)
Australiano/caucasiano	100	100 (100,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	1
Africano Bantu	73	52 (71,2)	20 (27,4)	1 (1,4)	0,85
Africano Creolo	85	78 (91,8)	6 (7,0)	1 (1,2)	0,95
Chineses do sul	97	97 (100,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	1

Devido à seletiva expressão em tecido estereidogênico, foi aventado que o polimorfismo *GSTA3* I71L altera o resultado final da estereidogênese em humanos, por alterar a função da proteína (TETLOW *et al.*, 2004). É sabido que hormônios esteróides, como estrógeno e progesterona, estão diretamente relacionados ao câncer de mama em mulheres e testosterona e estradiol ao tumor de próstata em homens (UKRAINTSEVA *et al.*, 2007). O estrogênio parece também atuar na origem do câncer de ovário (TILTMAN & ALI, 2001; SALEHI *et al.*, 2008). Assim, é possível que o polimorfismo gênico influencie o risco de ocorrência desses tumores em humanos.

Em cães, a expressão das GSTs varia individualmente (AZUMA *et al.*, 2002). Não é claro o controle genético do processo, mas foi observado que filhotes nascidos de cães com baixa expressão das GSTs também apresentam essa característica, o que sugere que possa ser determinada por herança mendeliana (AZUMA *et al.*, 2002).

Alta expressão de GSTA3 em duodeno e jejuno e reduzida expressão de GSTA3 no cólon foram identificadas em cães, apesar de não haver atividade estereoisomérica nesses tecidos. Assim, nesses animais, a enzima é expressa em tecidos atípicos para os humanos (GROOP *et al.*, 2006). Entretanto, permanece incerto o papel da enzima na carcinogênese em cães.

Ainda, é sabido que um nucleotídeo citosina ao invés de adenina na posição 211 do gene *GSTA3* foi identificado em fêmea da raça boxer (LINDBLAD-TOH *et al.*, 2005), utilizada na descrição do genoma canino, sugerindo que o alelo variante para humanos possa ser o selvagem em cães (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). É importante comentar que apenas um animal foi utilizado nesta análise.

Considerando que são desconhecidas as frequências dos polimorfismos *CYP1A2* C1117T e *GSTA3* I71L em cães de diferentes raças e cães SRD, que podem potencialmente alterar os resultados de estudos farmacocinéticos e epidemiológicos sobre tumores, foram definidos os objetivos deste estudo.

OBJETIVOS

Foram avaliados grupos de cães de raça pura boxer, rottweiler, pastor alemão e cães SRD, com os seguintes objetivos:

- Comparar as frequências de diferentes genótipos dos polimorfismos C117T *CYP1A2* e I71L *GSTA3* que codificam enzimas relevantes para o metabolismo de fármacos e carcinógenos em quatro grupos raciais diferentes de cães saudáveis
- Comparar as frequências de diferentes genótipos dos polimorfismos C117T *CYP1A2* e I71L *GSTA3* em animais estratificados por idade, sexo, padrão da dieta e condição corporal

CASUÍSTICA E MÉTODOS

1. Avaliação clínica

Foram incluídos no estudo 105 da raça boxer, 84 cães da raça rottweiler, 110 cães da raça pastor alemão e 99 animais SRD.

As amostras de cães de raça foram obtidas do canil K'douros da cidade de Sorocaba, do canil Blaze Diamond da cidade de Jundiaí, do canil Gama Grass da cidade de Sorocaba, do canil Rancho do Bola da cidade de Biritiba Mirim, do canil da Fazenda Talismã da cidade de Itapira, do canil Lord Manske da cidade de Itanhaém, dos canis Superhunde e Von Jeff da cidade de São José dos Campos, do canil da Polícia Militar de São Paulo, do canil da Polícia Militar de Campinas, do canil da Guarda Municipal de Sumaré, do canil da Guarda Municipal de Valinhos e animais de clientes da clínica veterinária “Espaço Animal” da cidade de Sumaré, do Estado de São Paulo.

Os animais foram classificados como puros de acordo com os critérios pré estabelecidos pela Sociedade Brasileira de Cinofilia (<http://www.sobracibr.org/portal2009>)¹ (Anexo 1) e foram avaliados pela aluna responsável pelo projeto (Figuras 1 a 4). Todos os animais propriedade de canis apresentaram pedigree e registro no Kenel Clube.

Foram também avaliados cães SRD, obtidos por indicação da “Organização Não Governamental Pata Amiga”, animais de clientes da “Clínica Veterinária Espaço Animal” e animais de clientes da “Clínica Veterinária Mariza Gemini Della Torre”, localizada na cidade de Sumaré. Os cães forma classificados como SRD pela aluna responsável pelo projeto.

Os dados relativos à idade, ao sexo, ao tipo de alimentação e ao escore corporal (Figura 1) foram obtidos de questionários específicos aplicados pela aluna responsável pelo projeto aos responsáveis pelos cães (Anexo 2).

¹ Sociedade Brasileira de Cinofilia

Foram consideradas como tipos de alimentação a caseira (MICHEL, 2006) e os alimentos industrializados (ração) (Berschneider, 2002; <http://anfalpet.org.br>)² (Anexo 3). Os animais foram distribuídos de acordo com a idade, o sexo, a raça, o padrão da dieta e o escore corporal (Figura 5).

² Associação Nacional dos Fabricantes de Alimentos para Animais de Estimação



Figura 1. Exemplo de cão de raça boxer



Figura 2. Exemplo de cão de raça rottweiler



Figura 3. Exemplo de cão de raça pastor alemão



Figura 4. Exemplo de cão sem raça definida



Case *et al.*, 1998

Figura 5. Escore corporal de cães de acordo com deposição de gordura

2. Análise molecular dos genes *CYP1A2* e *GSTA3*

2.1. Extração do DNA a partir dos leucócitos

O DNA genômico foi obtido de amostras de sangue periférico dos animais. O método utilizado foi o descrito por Woodhead *et al.* (1986), com modificações. Foram colhidos 4 ml de sangue periférico de cada animal, em frasco estéril contendo o anticoagulante ácido etilenodiaminotetracético (EDTA). A amostra foi centrifugada a 1.300 rpm por 11 minutos. Após o descarte do plasma, os eritrócitos contidos em 500 µl da solução remanescente foram lisados em um tubo cônico de 1,5 ml com uma mistura de sacarose 320 mM, Tris HCl 10 mM pH 7,5, MgCl₂ 5 mM e Triton X-100 1%. Em seguida, o botão de leucócitos obtido foi diluído em uma mistura de Tris HCl pH 7,5; EDTA 10 mM, NaCl 10 mM e sódio dodecil sulfato (SDS) 20%, compondo um tampão de digestão de proteínas juntamente com a proteinase K (20 mg/ml). A suspensão permaneceu em banho-maria a 55°C por duas horas. A seguir, foram adicionados 200 µl de cloreto de lítio à suspensão e esta foi levada ao freezer a – 20°C durante 15 minutos. Após isso, a solução foi centrifugada por 10 minutos a 13.000 rpm e o sobrenadante foi transferido para outro tubo cônico de 1,5 ml. A seguir, o DNA obtido dos leucócitos foi precipitado em etanol absoluto, reidratado em álcool 70% e diluído em água estéril a 37°C.

2.2. Identificação dos genótipos do polimorfismo C1117T do gene *CYP1A2*

Um fragmento do éxon 4 o qual contém o polimorfismo C1117T do gene *CYP1A2* foi amplificado por meio da técnica da reação a cadeia de polimerase (PCR) (MISE *et al.*, 2004a) utilizando-se para a reação 39,5 µl de água estéril, 5 µl de tampão da enzima (10 mM de tris HCl, pH8,0; 50 mM KCl), 2,5µl de cloreto de magnésio, 1,0 µl do DNA a ser estudado, 0,5 µL da mistura desoxirribonucléica – dNTPs (dATP, dGTP, dCTP, dTTP),

0,5 µl de *Taq* DNA polimerase e 1,0 µl de cada iniciador diluídos previamente para a concentração de 5 picomoles, totalizando um volume final de 50 µl.

Foram utilizados os iniciadores direto 5'-GATACAGAGAAAGATCCAGAAGGA-GTTG-3' e indireto 5'-GAGGTGAAGTTGGTGATGTGGCC-3', os quais foram desenhados com a utilização do programa computacional *Gene Runner* (<http://www.generunner.net/>). A reação foi conduzida inicialmente, por um ciclo a 95°C durante 4 minutos, para inativação da atividade de proteases que pudessem interferir com a reação enzimática, e posteriormente por 35 ciclos de amplificação em termociclador (MJ Research, Inc, Watertown, MA, EUA). Cada ciclo foi realizado sob as seguintes condições: 94°C durante 30 segundos (para desnaturação do DNA); 60°C durante 30 segundos (para ocorrer a ligação complementar entre os iniciadores e o DNA) e 72°C durante 45 segundos (para a síntese do DNA, com a enzima *Taq* DNA polimerase). Ao término dos 35 ciclos, o produto de amplificação foi mantido a 72°C durante 5 minutos (período final da síntese de DNA), completando um único ciclo. A seguir, as amostras foram mantidas sob refrigeração a 4°C. Fragmentos de 538 pares de base (pb) foram obtidos com a amplificação da região de interesse do gene *CYP1A2* e suas presenças foram confirmadas por eletroforese em gel de agarose 1,0%.

Os genótipos foram avaliados pela reação de seqüenciamento de DNA. As reações de seqüenciamento foram realizadas em seqüenciador de 96 capilares de acordo com o protocolo para o MeGABACE 1000 (Amersham Biosciences UK Limited, Amersham Place Little Chalfont, Buckinghamshire, England).

Foi utilizado para o sequenciamento, a solução *DYEnamic ET Dye Terminator Cycle Sequencing Kit* (com *Thermo Sequenase™ II* DNA Polimerase) GE Healthcare. O sistema baseia-se no princípio de amplificação como o de uma PCR convencional, porém são utilizados nucleotídeos marcados com fluorescência que, quando excitados por luz laser, emitem um espectro de luz específico para cada base. Esses nucleotídeos,

quando incorporados durante a etapa de extensão das novas fitas de DNA, são terminadores de cadeia, de modo que, ao final da reação, fragmentos de vários tamanhos foram formados, cada um com fluorescência relativa ao último nucleotídeo inserido.

Para cada reação de seqüenciamento foram utilizados 1 µL do produto da PCR já descrita, 1 µl do iniciador indireto 5'-GAGGTGAAGTTGGTGATGTGGCC-3' na concentração de 5 picomoles, 3 µl da solução *DYEnamic ET reagent premix* e água estéril para um volume final de 10 µl. A reação foi distribuída em placa própria para seqüenciamento previamente identificada e protegida da luz com papel alumínio, logo em seguida a placa foi levada ao termociclador automático e as amostras foram submetidas a 94°C por 20 segundos, a seguir, a 58 °C por 15 segundos para anelamento do iniciador da reação e, por último, a 60°C por 60 segundos para extensão da fita de DNA. Esse ciclo foi repetido por 30 vezes.

O produto da reação de seqüenciamento foi submetido à purificação com 2 µl de acetato de amônio 7,5 M e 50 µl de álcool etanol absoluto aos 10 µl de reação, com posterior homogeneização. Após incubação por 15 minutos, em temperatura ambiente protegido da luz, o produto foi centrifugado a 4000 rpm por 40 minutos. O sobrenadante foi removido por inversão e, a seguir, foram adicionados 100 µL de etanol 70% gelado à solução. Posteriormente o material foi novamente centrifugado a 4.000 rpm por 15 minutos. Novamente o sobrenadante foi desprezado por inversão do tubo. Para completa remoção do etanol, o material foi submetido a uma rápida centrifugação invertida de 7 segundos a 200 rpm e posteriormente foi incubado a temperatura de 55°C, protegido da luz para evaporação completa do álcool.

Para a eletroforese, adicionou-se 10 µl de *MEGABACE loading solution* em cada pocinho da placa. As amostras foram homogeneizadas e colocadas em gelo para, a seguir, serem colocadas no seqüenciador para a eletroforese.

O gel utilizado para a eletroforese foi o *MEGABACE Long Read Matrix* com poliacrilamida linear (LPAAs). As condições de eletroforese foram: voltagem de injeção da amostra 3 kV, tempo de injeção da amostra 120 segundos, voltagem de corrida 9 kV, tempo de corrida 100 minutos. A seqüência obtida das amostras dos animais do estudo foi analisada com a ajuda do programa disponível na Internet, *Chromas Lite*, versão 2.3.3.0 *Chromas MFC application* (http://www.technelysium.com.au/chromas_lite.html).

As frequências dos genótipos distintos do polimorfismo C1117T do gene *CYP1A2* foram analisadas em animais de raças distintas e SRD e em cães estratificados por idade, sexo, raça, padrão da dieta e escore corporal.

2.3. Identificação dos genótipos do polimorfismo I71L do gene *GSTA3*

Parte do éxon 4 do gene *GSTA3* foi amplificada por meio da PCR, com a utilização de uma mistura de 39,0 µl de H₂O estéril, 5 µl de tampão (10 mM de tris HCl, pH 8,0; 50 mM KCl), 2,5 µl de MgCl₂, 0,2 mM de cada nucleosídeo trifosfato (dATP, dCTP, dTTP e dGTP) e 0,5 µl de cada iniciador (10 pmoles) direto 5'-GTAAGAGGCAGATTGAGCAAAG-3' e indireto 5'-GACAGTCCTGCTCACCCAAG-3', segundo descrição de Tetlow (2004). Os iniciadores foram desenhados com o programa computacional *Gene Runner* (<http://www.generunner.net/>). A reação compreendeu 35 ciclos de incubação a 95°C por 2 segundos, a 57°C por 18 segundos e a 72°C por 30 segundos. Fragmentos de 401 pb foram os produtos da reação. Esses foram corados com brometo de etídio e visualizados, sob a luz ultravioleta, após eletroforese em gel de agarose 1%.

A presença ou a ausência do polimorfismo I71L nos animais foi avaliada por meio da digestão enzimática dos fragmentos amplificados. Esta foi realizada com a utilização de uma mistura de 10 µl do produto da PCR, 3,0 µl de H₂O estéril, 1,5 µl de tampão e 0,5 µL da enzima fast digest *Bsp12861* em banho-maria, a 37°C, por 15 minutos.

Os produtos da reação foram analisados em eletroforese em gel de agarose 3%, corados com brometo de etídio, para visualização dos fragmentos sob a luz ultravioleta. Fragmentos de 321 pb e 80 pb corresponderam ao alelo selvagem, já os fragmentos de 261 pb, 80 bp e 60 pb corresponderam ao alelo variante.

As frequências dos genótipos distintos do polimorfismo I71L do gene *GSTA3* foram analisadas em cães de raças distintas e SRD inseridos no estudo.

3. Aspectos éticos

O estudo molecular foi realizado em amostras de sangue periférico obtidas por punção venosa realizada após a obtenção dos termos de consentimento livre e esclarecido de proprietários dos animais (Anexo 4). O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética do Instituto de Biologia (Protocolo: 1120-1) (Anexo 5).

4. Análise estatística

O teste de verificação de equilíbrio de Hardy-Weinberg foi realizado com o intuito de verificar se ocorre a distribuição preferencial de algum dos genótipos avaliados em cães de diferentes raças e cães SRD utilizadas no estudo (BEIGUELMAN, 1995).

O significado estatístico das diferenças entre grupos foi calculado por meio do teste da probabilidade exata de Fisher ou qui-quadrado. A análise multivariada por regressão logística foi realizada para avaliar as associações entre genótipos e aspectos clínicos. Foram consideradas significantes as diferenças entre frequências cujo valor de *P* foi menor do que 0,05.

RESULTADOS

1. Avaliação clínica

As distribuições individualizadas dos animais incluídos no estudo de acordo com os aspectos clínicos estão apresentadas no Anexo 6. Já as frequências das distribuições dos animais de acordo com as características clínicas estão apresentadas na Tabela 3.

Tabela 3. Distribuições dos 398 cães inseridos no estudo de acordo com a raça, o sexo, a idade e a condição corporal

Variáveis	Número de animais (%)
Raça	
Boxer	105 (26,3)
Rottweiler	84 (21,1)
Pastor Alemão	110 (27,6)
Sem raça definida	99 (24,9)
Sexo	
Macho	176 (44,2)
Fêmea	222 (55,8)
Idade (anos)	
< 3	157 (39,4)
≥ 3	241 (60,6)
Padrão da dieta	
Caseira	8 (2,0)
Ração	390 (98,0)
Condição corporal	
Peso baixo ou magro	19 (4,7)
Peso normal	308 (77,4)
Excesso de peso	71 (17,8)

Os animais apresentaram idade entre seis meses e 15 anos (média \pm DP: 4 ± 3 anos; mediana: 3 anos). Números similares de animais de raça boxer, rottweiler, pastor alemão e de animais SRD foram avaliados no estudo. Ainda, cerca de um quarto da casuística foi constituída por animais com idade menor que dois anos. A maioria dos animais foi alimentada com ração. Dos 390 animais alimentados com ração, 43 receberam a ração básica, 40 a ração padrão, 107 a ração prêmio e 200 a ração superprêmio. Cinquenta dos 71 animais (70,4%) com excesso de peso foram fêmeas.

2. Análise molecular dos genes *CYP1A2* e *GSTA3*

2.1. Polimorfismos gênicos em animais de diferentes raças

As distribuições individualizadas dos 398 animais, de acordo com os polimorfismos C1117T do gene *CYP1A1* e I71L do gene *GSTA3* estão apresentadas no Anexo 6.

Os grupos de cães das raças boxer ($X^2= 0,01$; $P= 0,92$), rottweiler ($X^2= 0,08$; $P= 0,78$), pastor ($X^2= 0,12$; $P= 0,73$) e de cães SRD ($X^2= 0,41$; $P= 0,52$) estiveram em equilíbrio de Hardy-Weinberg para o locus C1117T do gene *CYP1A2*.

Genótipos variados dos referidos polimorfismos gênicos em cães analisados no estudo estão apresentados nas Figuras 6 a 9.

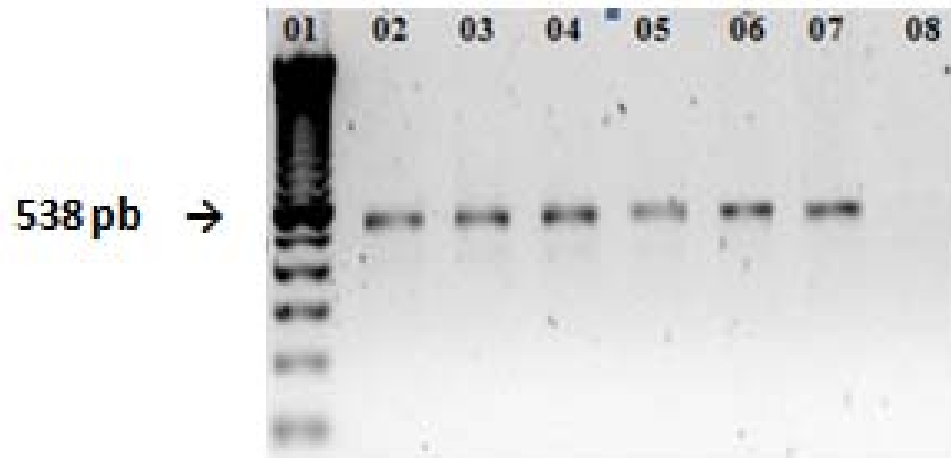


Figura 6. Eletroforese em gel agarose 1,0% de produtos da amplificação de um fragmento de 538 pares de bases (pb) do éxon 4 do gene *CYP1A2*, em amostra de sangue periférico de cães, por meio da reação em cadeia da polimerase. O marcador do tamanho do DNA, ladder 100 pb, está apresentado nas coluna 1. Os resultados obtidos em animais estão apresentados nas colunas 2 a 7. O controle negativo, amostra sem DNA, está representado na coluna 8

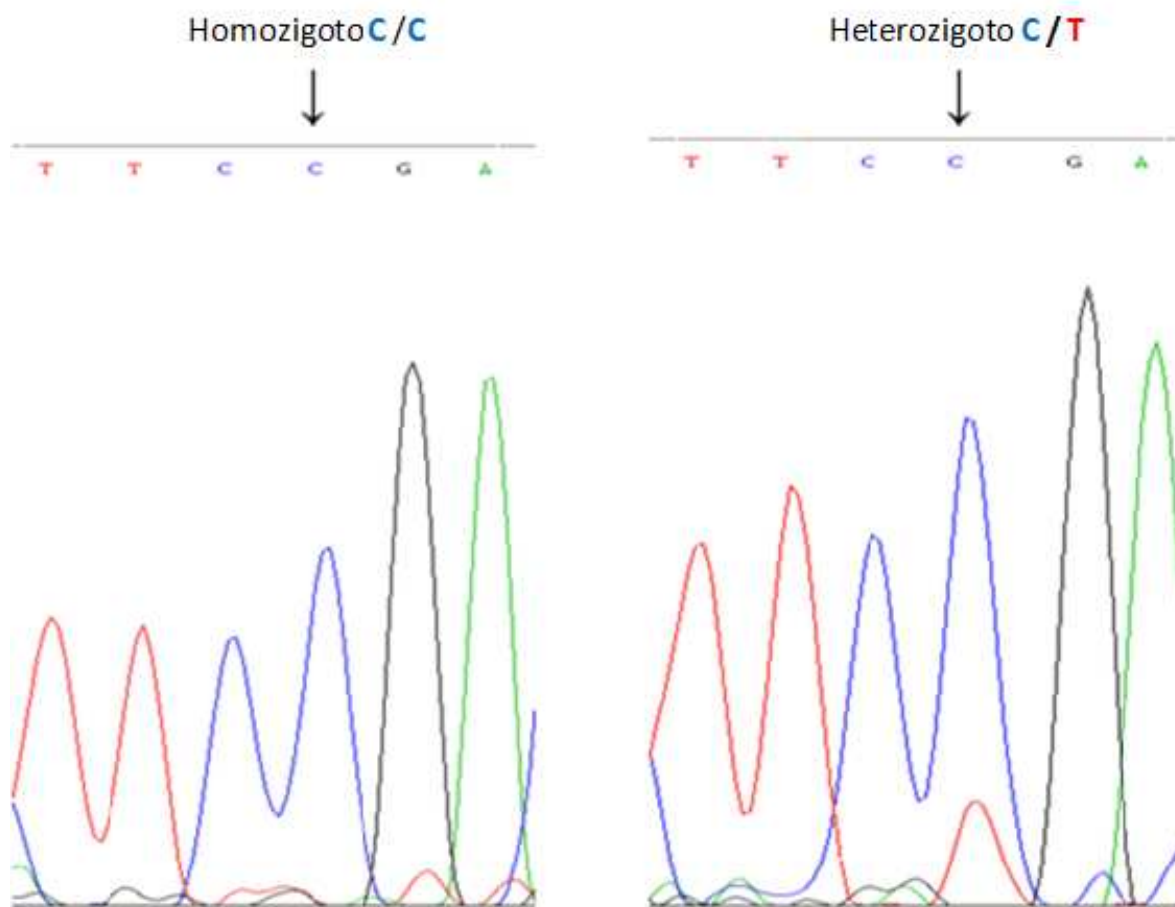


Figura 7. Eletroferograma parcial de uma sequência de DNA contendo 538 pares de bases do éxon 4 do gene *CYP1A2*, obtida no sequenciador automático Megabace 100. Do lado esquerdo, amostra de animal sem raça definida com o genótipo CC do polimorfismo C1117T na posição 378 da cadeia de DNA (seta). Do lado direito, amostra de animal sem raça definida com o genótipo CT do polimorfismo C1117T na posição 378 da cadeia de DNA (seta)

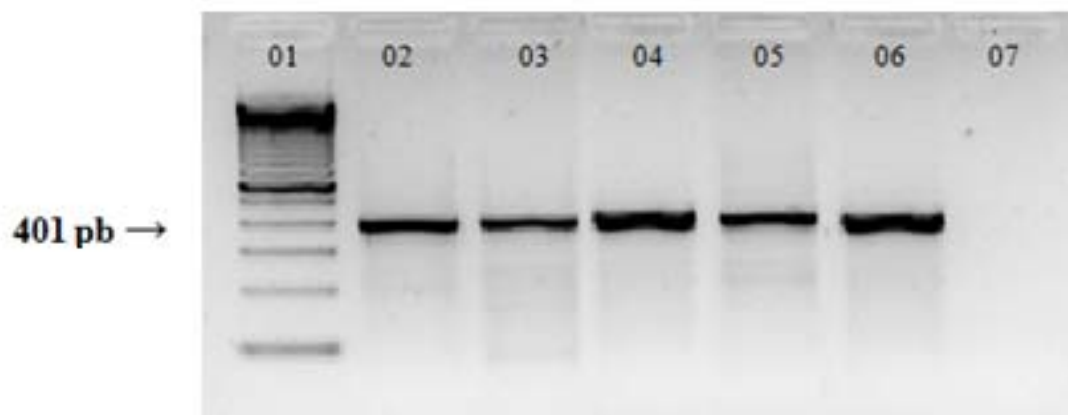


Figura 8. Eletroforese em gel agarose 1,0% de produtos da amplificação de fragmento de 401 pares de bases (pb) do éxon 4 do gene *GSTA3*, em amostras de sangue periférico de cães, por meio da reação em cadeia da polimerase. O marcador do tamanho do DNA, ladder 100 pb, está apresentado na coluna 1. Os resultados obtidos em amostras de cães variados do estudo estão apresentados nas colunas 2 a 6. O controle negativo, amostra sem DNA, está apresentado na coluna 7

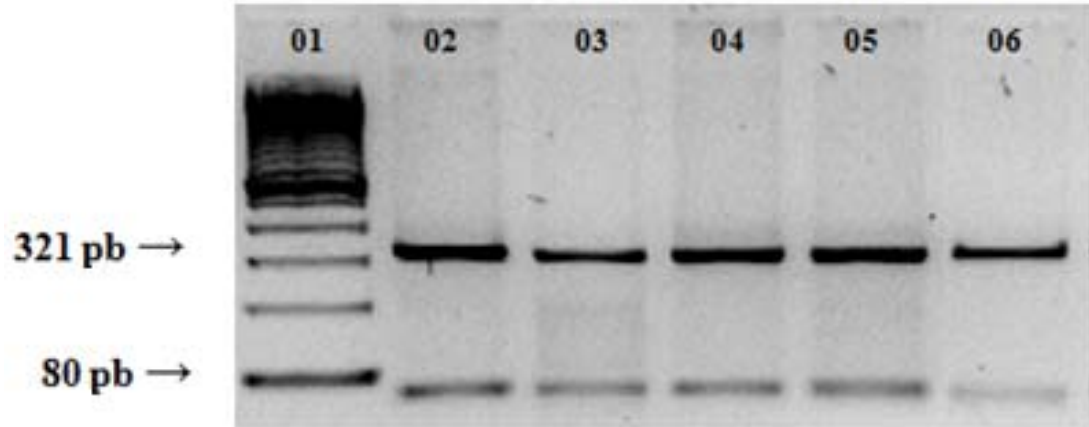


Figura 9. Produtos de digestão enzimática para a identificação do polimorfismo I71L do gene *GSTA3*, em gel de agarose 3%. O marcador de tamanho de DNA ladder 100 pares de bases (pb) está apresentado coluna 1. Os resultados obtidos de amostras de cães com o genótipo homozigoto selvagem estão representados nas colunas 2 a 6. Os fragmentos de 321 pb e 80 pb correspondem ao alelo homozigoto selvagem, pois o fragmento amplificado apresenta sítio de restrição para digestão enzimática

As frequências dos genótipos do polimorfismo C1117T do gene *CYP1A2* em cães analisados estão apresentadas na Tabela 4. Já as comparações das frequências dos genótipos do polimorfismo C1117T do gene *CYP1A2* em cães de raça e SRD estão apresentadas nas Tabelas 5 e 6.

Tabela 4. As frequências dos genótipos do polimorfismo *CYP1A2* C1117T em cães de diferentes raças e cães sem raça definida

Animais	<i>CYP1A2</i> C1117T em número (%)		
	CC	CT	TT
Boxer	103 (98,1)	2 (1,9)	0 (0,0)
Rottweiler	79 (94,1)	5 (5,9)	0 (0,0)
Pastor alemão	103 (93,6)	7 (6,4)	0 (0,0)
SRD	87 (87,9)	12 (12,1)	0 (0,0)

CC: homozigoto selvagem, CT: heterozigoto, TT: homozigoto variante, SRD: sem raça definida

Os genótipo selvagem CC foi mais comum do que o genótipo heterozigose CT em cães de todas as raças e cães SRD. O genótipo variante em homozigose TT não foi identificado em qualquer dos animais analisados.

Tabela 5. Comparações de frequências dos genótipos do polimorfismo *CYP1A2* C1117T em cães de diferentes raças e cães sem raça definida

Animais	<i>CYP1A2</i> C1117T em número (%)		
	CC	CT	TT
Boxer	103 (98,1)	2 (1,9)	0 (0,0)
Rottweiler	79 (94,1)	5 (5,9)	
Valor de <i>P</i>	0,22		
Boxer	103 (98,1)	2 (1,9)	0 (0,0)
Pastor alemão	103 (93,6)	7 (6,4)	0 (0,0)
Valor de <i>P</i>	0,17		
Boxer	103 (98,1)	2 (1,9)	0 (0,0)
SRD	87 (87,9)	12 (12,1)	0 (0,0)
Valor de <i>P</i>	0,005		
Rottweiler	79 (94,15)	5 (5,9)	0 (0,0)
Pastor alemão	103 (93,6)	7 (6,4)	0 (0,0)
Valor de <i>P</i>	0,85		
Rottweiler	79 (94,1)	5 (5,9)	0 (0,0)
SRD	87 (87,9)	12 (12,1)	0 (0,0)
Valor de <i>P</i>	0,24		
Pastor alemão	103 (93,6)	7 (6,4)	0 (0,0)
SRD	87 (87,9)	12 (12,1)	0 (0,0)
Valor de <i>P</i>	0,23		

CC: homocigoto selvagem, CT: heterocigoto, TT: homocigoto variante, SRD: sem raça definida, OR: razão das chances, IC: intervalo de confiança

Tabela 6. Comparações de frequências dos genótipos do polimorfismo *CYP1A2* C1117T entre cães de raças distintas e sem raça definida

Animais	<i>CYP1A2</i> C1117T em número (%)		
	CC	CT	TT
Boxer	103 (98,1)	2 (1,9)	0 (0,0)
Outros cães de raça	182 (93,8)	12 (6,2)	0 (0,0)
Valor de <i>P</i>	0,94		
Boxer	103 (98,1)	2 (1,9)	0 (0,0)
Cães com e sem raça definida	269 (91,8)	24 (8,2)	0 (0,0)
Valor de <i>P</i>	0,25		
Rottweiler	79 (94,1)	5 (5,9)	0 (0,0)
Outros cães de raça	206 (95,8)	9 (4,2)	0 (0,0)
Valor de <i>P</i>	0,54		
Rottweiler	79 (94,1)	5 (5,9)	0 (0,0)
Cães com e sem raça definida	293 (93,3)	21 (6,7)	0 (0,0)
Valor de <i>P</i>	0,80		
Pastor alemão	103 (93,6)	7 (6,4)	0 (0,0)
Outros cães de raça	182 (96,3)	7 (3,7)	0 (0,0)
Valor de <i>P</i>	0,29		
Pastor alemão	103 (93,6)	7 (6,4)	0 (0,0)
Cães com e sem raça definida	372 (93,5)	19 (6,5)	0 (0,0)
Valor de <i>P</i>	0,93		
Outros cães de raça	285 (95,3)	14 (4,7)	0 (0,0)
SRD	87 (87,9)	12 (12,1)	0 (0,0)
Valor de <i>P</i>	0,02		
Todos os cães de raça	372 (96,4)	14 (3,6)	
SRD	87 (87,9)	12 (12,1)	
Valor de <i>P</i>	0,002		

CC: homocigoto selvagem, CT: heterocigoto, TT: homocigoto variante, SRD: sem raça definida, OR: razão das chances, IC: intervalo de confiança

Observamos que as frequências do genótipo homozigoto selvagem CC em cães de raça, em cães de raça boxer e em cães de outras raças que não boxer foram maiores do que a frequência do genótipo homozigoto selvagem CC em cães SRD. Entretanto, frequências similares dos genótipos do gene *CYP1A2* foram observadas entre cães de diferentes raças e entre cães da raça rottweiler, pastor alemão e cães SRD.

Apenas o genótipo variante CC do polimorfismo I71L do gene *GSTA3* de humanos foi identificado em todos os cães analisados no estudo.

2.2. Polimorfismos gênicos e aspectos clínicos

As frequências dos genótipos do polimorfismo C1117T do gene *CYP1A2* em cães das raças boxer, rottweiler e pastor alemão e de cães SRD estratificados por idade, sexo, padrão da dieta e escore corporal, estão apresentadas nas Tabelas 7, 8, 9 e 10, respectivamente.

Tabela 7. Comparações de frequências dos genótipos do polimorfismo *CYP1A2* C1117T em 105 cães da raça boxer estratificados por aspectos clínicos

Animais	<i>CYP1A2</i> C1117T em número (%)		
	CC	CT	TT
Idade mediana			
< 3 anos	46 (44,7)	1 (50,0)	0 (0,0)
≥ 3 anos	57 (55,3)	1 (50,0)	0 (0,0)
OR (IC 95%)	1,2		
Valor de <i>P</i>	1,00		
Sexo			
Macho	38 (36,9)	2 (100,0)	0 (0,0)
Fêmea	65 (63,1)	0 (0,0)	0 (0,0)
OR (IC 95%)	Não avaliável		
Valor de <i>P</i>	Não avaliável		
Padrão dieta			
Caseira	1 (1,0)	0 (0,0)	0 (0,0)
Ração	102 (99,0)	2 (100,0)	0 (0,0)
OR (IC 95%)	Não avaliável		
Valor de <i>P</i>	Não avaliável		
Escore corporal			
1 + 2	87 (84,5)	2 (100,0)	0 (0,0)
3	16 (15,5)	0 (0,0)	0 (0,0)
OR (IC 95%)	Não avaliável		
Valor de <i>P</i>	Não avaliável		

CC: homocigoto selvagem, CT: heterocigoto, TT: homocigoto variante, OR: razão das chances ajustadas por meio da análise multivariada, IC: intervalo de confiança

Tabela 8. Comparações de frequências dos genótipos do polimorfismo *CYP1A2* C1117T em 84 cães da raça rottweiler estratificados por aspectos clínicos

Animais	<i>CYP1A2</i> C1117T em número (%)		
	CC	CT	TT
Idade mediana			
< 3 anos	31 (39,2)	4 (80,0)	0 (0,0)
≥ 3 anos	48 (60,8)	1 (20,0)	0 (0,0)
OR (IC 95%)	6,2		
Valor de <i>P</i>	0,15		
Sexo			
Macho	34 (43,0)	3 (60,0)	0 (0,0)
Fêmea	45 (57,0)	2 (40,0)	0 (0,0)
OR (IC 95%)	2,8		
Valor de <i>P</i>	0,65		
Padrão dieta			
Caseira	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)
Ração	79 (100,0)	5 (100,0)	0 (0,0)
OR (IC 95%)	Não avaliável		
Valor de <i>P</i>	Não avaliável		
Escore corporal			
1 + 2	53 (67,1)	4 (80,0)	0 (0,0)
3	26 (32,9)	1 (20,0)	0 (0,0)
OR (IC 95%)	1,8		
Valor de <i>P</i>	1,00		

CC: homocigoto selvagem, CT: heterocigoto, TT: homocigoto variante, OR: razão das chances ajustada por análise multivariada, IC: intervalo de confiança

Tabela 9. Comparações de frequências dos genótipos do polimorfismo *CYP1A2* C1117T em 110 cães da raça pastor alemão estratificados por aspectos clínicos

Animais	<i>CYP1A2</i> C1117T em número (%)		
	CC	CT	TT
Idade mediana			
< 2,5 anos	29 (28,2)	3 (42,9)	0 (0,0)
≥ 2,5 anos	74 (71,8)	4 (57,1)	0 (0,0)
OR (IC 95%)	1,4		
Valor de <i>P</i>	0,41		
Sexo			
Macho	61(59,22)	6 (85,7)	0(0,0)
Fêmea	42(40,78)	1 (14,3)	0(0,0)
OR (IC 95%)	4,2		
Valor de <i>P</i>	0,24		
Padrão dieta			
Caseira	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)
Ração	103 (100,00)	7 (100,0)	0 (0,0)
OR (IC 95%)	Não avaliável		
Valor de <i>P</i>	Não avaliável		
Escore corporal			
1 + 2	98 (95,2)	7 (100,0)	0 (0,0)
3	5 (4,8)	0(0,0)	0 (0,0)
OR (IC 95%)	Não avaliável		
Valor de <i>P</i>	Não avaliável		

CC: homocigoto selvagem, CT: heterocigoto, TT: homocigoto variante, OR: razão das chances ajustada pro análise multivariada, IC: intervalo de confiança

Tabela 10. Comparações de frequências dos genótipos do polimorfismo *CYP1A2* C1117T em 99 cães sem raça definida estratificados por aspectos clínicos

Animais	<i>CYP1A2</i> C1117T em número (%)		
	CC	CT	TT
Idade mediana			
< 5 anos	40 (46,0)	6 (50,0)	0 (0,0)
≥ 5 anos	47 (54,0)	6 (50,0)	0 (0,0)
OR (IC 95%)	1,2		
Valor de <i>P</i>	0,96		
Sexo			
Macho	29 (33,3)	3 (25,0)	0 (0,0)
Femea	58 (66,7)	9 (75,0)	0 (0,0)
OR (95% IC)	0,7		
Valor de <i>P</i>	0,74		
Padrão dieta			
Caseira	6 (6,9)	1 (8,3)	0 (0,0)
Ração	81 (93,1)	11 (91,7)	0 (0,0)
OR (95% IC)	1,3		
Valor de <i>P</i>	1,00		
Escore corporal			
1 + 2	67 (77,0)	9 (75,0)	0 (0,0)
3	20 (23,0)	3 (25,0)	0 (0,0)
OR (95% IC)	1,1		
Valor de <i>P</i>	1,00		

CC: homocigoto selvagem, CT: heterocigoto, TT: homocigoto variante, OR: razão das chances ajustada por análise multivariada, IC: intervalo de confiança

Frequências similares dos genótipos distintos do polimorfismo *CYP1A2* C1117T foram observadas em cães das diferentes raças e cães sem raça definida estratificados por aspectos clínicos.

DISCUSSÃO

Nós avaliamos neste estudo as frequências dos genótipos do polimorfismo C1117T do gene *CYP1A2* e do polimorfismo I71L do gene *GSTA3*, relacionados ao metabolismo de fármacos e carcinógenos, em cães de raça pura e em cães SRD.

Observamos inicialmente que o genótipo homozigoto selvagem CC do polimorfismo C1117T do gene *CYP1A2* foi mais comum em cães de raça, particularmente boxers, do que em cães SRD. Os genótipos distintos não estiveram associados a aspectos clínicos analisados no estudo.

Até então as frequências dos genótipos do polimorfismo *CYP1A2* C1117T só haviam sido avaliadas em 149 cães da raça beagle por *Mise et al.* (2004a). Em nosso estudo, conduzido em cães de raça e cães SRD, a frequência do genótipo homozigoto selvagem foi maior do que a encontrada por *Mise et al.* (2004a) (93,5% versus 37,6%, $P < 0,0001$), enquanto que as frequências do genótipo heterozigoto (6,5% versus 51,0%, $P < 0,0001$) e do genótipo homozigoto variante (0,0% versus 11,4%; $P < 0,0001$) foram menores do que as frequências por eles identificadas, respectivamente. Tanto nossos cães quanto os analisados por *Mise et al.* (2004a) ($X^2 = 1,35$; $P = 0,25$) estiveram em equilíbrio de Hardy-Weinberg e, portanto, amostras representativas das diversas raças de cães e de cães SRD foram analisadas nos estudos.

A princípio as diferenças de frequências genotípicas entre o presente e o primeiro estudo pareciam resultar dos diferentes métodos utilizados para a identificação dos genótipos distintos do polimorfismo *CYP1A2* C1117T pelos pesquisadores, pois *Mise et al.* (2004a) utilizaram a reação em cadeia da polimerase (PCR) e digestão enzimática e nós utilizamos o método de sequenciamento gênico para obtenção dos genótipos.

O sequenciamento gênico parece melhor para definir genótipos do que a PCR seguida de digestão enzimática, onde digestões parciais dos fragmentos de interesse amplificados podem dar origem a excessos de heterozigotos (COTTON, 2000). Entretanto, *Tenmizu et al.* (2004) também realizaram as genotipagens desse polimorfismo

gênico em beagles por sequenciamento e encontraram frequências semelhantes as de Mise *et al.* (2004). Nós não avaliamos beagles em nosso estudo. Assim, as diferenças de frequências dos genótipos parecerem ser atribuídas as raças dos animais avaliados nos diferentes estudos e não ao método empregado para a genotipagem. Os resultados desses estudos, em seu conjunto, sugerem que o genótipo variante do polimorfismo gênico parece ser mais comum em cães da raça beagle do que em cães das raças boxers, rottweiler e pastor alemão e cães SRD.

As CYPs são responsáveis por 70-80% da fase I do metabolismo de xenobióticos, incluindo medicamentos e carcinógenos de componentes da dieta e ambientais (EVANS & RELLING, 1999; NEBERT & DALTON, 2006) e também influenciam a atividade oxidativa em microssomos hepáticos de várias espécies animais, como roedores, cães, primatas e humanos (SHIMADA *et al.*, 1997). As enzimas de maior significância neste contexto são as do sistema do citocromo P450 (BUNCH, 1993; DAVIES & PORTMANN, 1994).

As CYPs podem inativar uma droga ativa, como as fenotiazinas, ou mais frequentemente criar um metabólito ativo a partir de uma “pré-droga” inativa, como a prednisona, para a sua forma ativa, a prednisolona, ou ainda a conversão do diazepam para a sua forma ativa, o oxazepam (NIMS *et al.*, 1997; VIRANIA *et al.*, 1999).

Outra função das CYPs é a transformação de uma droga ativa em outra droga com atividade semelhante, como a conversão da fenilbutazona para oxifenilbutazona e a produção de metabólitos anticonvulsivantes ativos, fenobarbital e feniletilmalonamida, a partir da primidona (BUNCH, 1990; DAVIES & PORTMANN, 1994).

As principais causas de variação individual e interindividual na atividade do gene CYP em humanos são as interações medicamentosas e as causas fisiológicas, como o estado hormonal, as comorbidades, o ritmo circadiano e os polimorfismos genéticos (PASCUSI & VILAREM, 2008).

Enzimas com atividades distintas, codificadas por polimorfismos do gene *CYP1A2*, podem determinar respostas diversas a medicamentos tanto em humanos como em cães. De fato, TENMIZU *et al.* (2004) e TENMIZU *et al.* (2006) classificaram beagles com o genótipo *CYP1A2* 1117TT como metabolizadores lentos de medicamentos, como anticonvulsivantes e antiinflamatórios, com possível consequente menor benefício durante terapêutica medicamentosa de doenças.

Desta forma, vale ressaltar que cães da mesma raça podem atuar no metabolismo de xenobióticos de forma distinta e assim, possivelmente modificar resultados de estudos farmacocinéticos de medicamentos conduzidos nestes animais. Até onde atinge o nosso conhecimento, não se encontra estabelecido se o polimorfismo *CYP1A2* C1117T existe em humanos e se interfere com o metabolismo de medicamentos.

As CYPs, incluindo a *CYP1A2*, são essenciais para a ativação de carcinógenos, dentre eles as AA e os HAPs provenientes de alimentos defumados e gordurosos grelhados na brasa (GOODHERHAM *et al.*, 1996). Assim, a susceptibilidade a tumores pode sofrer influência de polimorfismos nos genes que as codificam (DANIELSON, 2002).

As CYPs atuam no metabolismo de HAPs da exposição ambiental a gasolina, tiner, água ras, varsol, a gases de exaustão de veículos automotores e a produtos da combustão do tabaco e de indústrias petroquímica e siderúrgica (GUENGERICH, 2001; HECHT, 2002; ZANGER *et al.*, 2008), que estão diretamente relacionados à carcinogênese química. A *CYP1A2* age na conversão de HAPs (HECHT, 2002), convertendo-os em diol-epóxido que posteriormente é convertido em PA o-quinona (7,8-diona), que por sua vez está apto a formar ligações estáveis com o DNA (CAVALIERI *et al.*, 2005). Estas ligações covalentes com centros nucleicos presentes em macromoléculas biológicas como ácido desoxirribonucléico (DNA) ou ácido ribonucléico (RNA) causam perturbações conformacionais em tais moléculas determinando mutações (MILLER, 1978). Devido ao fato de uma quantidade considerável de compostos pré

cancerígenos poder ser metabolizado a mais de uma espécie eletrofílica e devido a variedade de centros nucleófilos nas macromoléculas, o número destas ligações chamados aductos é conseqüentemente extenso e sua estrutura variável (BELAND & KADLUBAR, 1990).

As CYPs atuam ainda no metabolismo das AA, que estão associadas à etiologia do câncer em vários órgãos, como fígado, mama, pulmões, esôfago, rins e bexiga. Os compostos 2-aminonaftaleno(1a) e o 4-aminobifenilo (3a) estão diretamente relacionados ao câncer (VINEIS & CAPORASO, 1995). A confirmação inequívoca dos danos celulares provocados por estes compostos surgiu na década de 1930, após ter sido verificado que cães e macacos desenvolveram neoplasias após doses elevadas de 2-aminonaftaleno na dieta (HUEPER, 1938).

As CYPs também afetam vias de transdução de sinal, alteram o ciclo celular e causam distúrbios na apoptose ou o crescimento celular aberrante (NEBERT & DALTON, 2006), que podem estar envolvidos com a origem de tumores.

Encontramos em nosso estudo alta freqüência do genótipo homozigoto selvagem do polimorfismo *CYP1A2* C1117T, mais eficaz na ativação de carcinógenos do que o variante, em boxers, rottweilers, pastores alemães e cães SRD. A freqüência do genótipo foi ainda maior em cães de raça do que em cães SRD.

Não há relato na literatura sobre predisposição ao câncer relacionado à exposição a carcinógenos endógenos ou exógenos em beagles mas tal associação foi descrita há em boxers, rottweilers e pastores alemães (PASTOR *et al.*, 2009). Os cães da raça beagle podem ser menos capazes de ativar carcinógenos do que os cães da raça analisados em nosso estudo e, assim, estarem mais protegidos da ocorrência de câncer. Estudos adicionais são necessários para verificar se tais associações são consistentes.

Devido à proximidade com os humanos e por compartilhar o ambiente com estes, os cães comumente desenvolvem os mesmos tipos de neoplasias que seus proprietários, apresentando, inclusive, padrões similares de metástases do tumor primário (WATERS & WILDASIN, 2006). Tal observação sugere que o ambiente também exerça influência importante na carcinogênese de cães.

Fatores variados como o o padrão da dieta, a exposição a produtos químicos, pesticidas, poluentes químicos e nucleares, disordens imunológicas, infecções virais e predisposição genética parecem associados à origem de linfomas do tipo não Hodgkin em humanos e em cães (Cartwright et al., 1999; Muller et al., 2005).

A incidência do tumor aumenta significativamente em humanos e aparentemente em cães de vários países do mundo (CHASSAGNE-CLEMENT *et al.*, 1999). O tipo de linfoma que acomete cães e humanos com maior frequência é o de linfócitos B do tipo não Hodgkin, o cão representa um modelo interessante para pesquisa na doença devido a alta similaridade entre o comportamento biológico deste tipo de linfoma entre essas distintas espécies (MODIANO *et al.*, 2005). De forma geral, esses tumores estão associados com à exposição a carcinógenos endógenos e exógenos que são metabolizados por enzimas do sistema P450 e que, portanto, são codificadas por genes polimórficos.

Estudos realizados por Pastor *et al.* (2009) tiveram como objetivo identificar as raças com maior incidência de linfoma em um grupo de 680 animais e verificaram que a maioria dos cães com linfoma identificados no estudo eram da raça boxer (OR: 10,02; $P= 0,001$), pastor alemão (OR: 0,31; $P > 0,1$) e rottweiler (OR: 0,11; $P > 0,10$). Entre os animais que apresentaram linfoma cutâneo, 24% eram da raça boxer, e entre os animais que desenvolveram linfoma pleomórfico misto de células T, 33% eram boxers. Coincidentemente esses animais residiam em áreas de cidades francesas com alta taxa

de poluição, o que sugere a participação dos carcinógenos ambientais e fatores genéticos na origem do linfoma em cães.

Em nosso estudo não foi observada associação entre o padrão da dieta e frequência de determinado genótipo. No entanto, já é muito conhecido que o padrão da dieta está definitivamente associado ao câncer. O consumo de vegetais de cor verde escuro, amarela e laranja parece reduzir o risco de ocorrência de neoplasias em humanos (RIBOLI *et al.*, 1991; MICHAUD *et al.*, 2000) e também em cães (RAGHAVAN *et al.*, 2005). Vegetais como couveflor, brócoli, repolho, foliácea de cor verde escura, mostarda, agrião são alimentos ricos em um composto fitoquímico denominado isotiocianato, o qual possui atividade antitumoral (VERHOEVEN *et al.*, 1997; TALALAY & FAHEY, 2001). Esta habilidade do isotiocianato consiste em inibir a ação das enzimas de fase I de metabolização xenobióticos e induzir a ação de enzimas de fase II principalmente as GSTs. Dessa forma protege as células dos eventuais danos causados por carcinógenos, como as AA oriundas do cozimento da carne em altas temperaturas ou quando a carne é grelhada, tostada ou churrasqueada (KNIZE *et al.*, 1999; STECK & HEBERT, 2009). De maneira geral, são três os tipos de AA formados durante o preparo inadequado da carne: 2-amino-1-methyl-6-phenyl-imidazo[4,5-b]pyridine (PhIP), 2-amino-3,8-dimethylimidazo[4,5-f]quinoxaline (MeIQx), e 2-amino-3,4,8-trimethylimidazo[4,5-f]quinoxaline (DiMeIQX) (SINHA, 2000).

Pérez *et al.* (1998; 2000) demonstraram que a incidência de neoplasia mamária e displasia mamária foi maior em cadelas alimentadas com alimento caseiro que em cadelas alimentadas com ração. Entretanto, vale ressaltar que a dieta caseira fornecida era rica em carne vermelha bovina e suína e pobre em carne de frango. Ainda, o questionário aplicado aos proprietários dos animais não abordou o método de preparo do alimento e nem a composição geral da dieta. Assim, não foi possível saber se além da carne houve também ingestão de verdura e cereais.

As CYPs também atuam na síntese de substâncias endógenas como hormônios esteróides (NELSON *et al.*, 1996; NEBERT & RUSSEL, 2002; NELSON *et al.*, 2004), que atuam como carcinógenos em tecidos específicos como mama e próstata. Atuam na transformação de ácidos biliares à colesterol e a hormônios esteróides, incluindo as CYP3, CYP7, CYP8, CYP27, CYP39, e CYP46 (SINAL *et al.*, 2000; NEBERT *et al.*, 2002).

Durante a diferenciação sexual na embriogênese, o fator de transcrição do fator esteróide-1, membro da família de genes receptores hormonais nucleares, é fundamental na regulação de genes P450 que participam da síntese de hormônios esteróides, incluindo as CYP11, CYP17, CYP19, e CYP21 (SIMPSON *et al.*, 2000). Por exemplo, a CYP 17A1, necessária para a síntese de cortisol, testosterona e estrógeno, tem dupla função pois age catalizando a reação de 17 α -hidroxilação dos substratos esteróides e clivando simultaneamente com a oxidação da cadeia lateral dos mesmos substratos, enquanto o CYP 19A1 converte precursores androgênicos em estrógenos pela ação da aromatização dos substratos esteróides ambos estão localizados no retículo endoplasmático (SIMPSON *et al.*, 2000).

Não há qualquer tipo de estudo que caracterize as frequências dos genótipos distintos do gene polimórfico *CYP1A2* C1117T em cães com alta prevalência de câncer das raças boxers, rottweiler e pastor alemão. Assim, descrevemos pela primeira vez que o alelo variante, com menor atividade na ativação de carcinógenos, é pouco comum nesses cães, o que pode constituir uma característica de susceptibilidade ao câncer. Como a frequência do genótipo selvagem foi maior em cães de raça, particularmente boxers, do que em cães SRD, podemos também sugerir que as frequências dos genótipos distintos desse plimorfismo, à semelhança de humanos, variam nas diferentes raças.

Também não temos conhecimento da existência de estudos caso-controle sobre a influência desses genótipos no risco de ocorrência de câncer em animais de diferentes raças. Esses certamente serão estudos conduzidos por pesquisadores do nosso grupo, em futuro próximo, dando continuidade a essa linha de investigação.

O segundo achado significativo do nosso estudo foi a identificação apenas do genótipo variante CC do polimorfismo I71L do gene *GSTA3*, relacionado à detoxificação de carcinógenos, em nossos cães de raça e cães SRD.

Em humanos o gene *GSTA3* é polimórfico e as frequências dos genótipos distintos varia em indivíduos de diferentes populações étnicas (TETLOW *et al.*, 2004). Na posição 211 do gene pode ocorrer a presença de um A, que corresponde a adenina e caracteriza o alelo selvagem ou de de um nucleotídeo C, que corresponde a citosina e caracteriza o alelo variante. Assim, isoleucina é substituída por leucina na proteína codificada. A proteína codificada pelo alelo selvagem A é mais eficaz na detoxificação de carcinógenos do que o variante C (TETLOW *et al.*, 2004). Ainda, diferenças significativas de suas funções na atividade esteróide isomerase foram também descritas (TETLOW *et al.*, 2004).

As GSTs constituem uma família de enzimas detoxificantes, que fazem parte do mecanismo de proteção contra a carcinogênese química (KETTERER, 1988; HAYES & PULFORD, 1995; CHEN *et al.*, 1996; COTTON *et al.*, 2000; SLATTERY *et al.*, 2000; STECK & HEBERT, 2009). Estas enzimas catalisam a conjugação de moléculas eletrofílicas de carcinógenos à glutathione reduzindo-os a produtos menos tóxicos (CLAPPER *et al.*, 1991; MOORGHEN *et al.*, 1991; HAYES & PULFORD, 1995; CHEN *et al.*, 1996; ZHANG *et al.*, 1999; STECK & HEBERT, 2009).

As GSTs inativam ou tornam menos tóxicas várias substâncias endógenas, como os hormônios estróides (TETLOW *et al.*, 2004), e exógenas, como as AA e os HAPs de alimentos defumados e gordurosos grelhados na brasa, tostados, churrasqueados ou cozidos à alta temperatura (STECK & HEBERT, 2009). Ainda, inativam os HAPs da

exposição ambiental a benzeno, presente na gasolina, tiner, água ras, varsol, a gases de exaustão de veículos automotores e a produtos da combustão do tabaco e de indústrias petroquímica e siderúrgica (TOWNSEND & TEW, 2003), que estão diretamente relacionados à carcinogênese química.

A classe alfa da glutathione S-transferase em humanos é composta por cinco genes, *GSTA1* a *GSTA5* (COLES & KADLUBAR, 2005).

Os genes *GSTA1* e *GSTA2* catalizam a conjugação de uma ampla gama de eletrófilos, possuem atividade esteróide isomerase dependente e atividade peroxidase glutathione dependente Já os *GSTA3* e *GSTA4* participam também do metabolismo de carcinógenos ambientais. Os alelos selvagens e variantes dos genes *GSTA1*, *GSTA2* e *GSTA3* da classe alpha expressam quantidades distintas das enzimas ou enzimas com capacidades funcionais diferentes (COLES *et al.*, 2001; TOWNSEND & TEW, 2003; NING *et al.*, 2004; TETLOW *et al.*, 2004; YOSHIDA *et al.*, 2007).

Os principais substratos metabolizados pela enzima *GSTA3* do sistema da glutathione S-transferase estão apresentados na Tabela 12.

As GSTs da classe alfa estão amplamente expressas em tecidos humanos, sendo que as *GSTA3* estão presentes particularmente em tecidos com atividade estereoisomerase dependente como placenta, ovários, testículos e glândula adrenal, pulmão, estômago e traquéia (MOREL *et al.*, 1994; JOHANSSON & MANNERVICK, 2001; MOREL *et al.*, 2002).

Em cães a expressão das GSTs pode variar individualmente (WATANABE *et al.*, 2006), porém como esse processo é controlado ainda não é claro, é sabido apenas que o mesmo ocorre geneticamente por herança mendeliana (WATANABE *et al.*, 2006). Em cães foi identificada alta expressão de *GSTA3* em duodeno, jejuno e reduzida expressão de *GSTA3* no cólon (GROOP *et al.*, 2006).

Devido à seletiva expressão em tecido estereidogênico podemos inferir que o polimorfismo I71L do gene *GSTA3* altera o resultado final da estereidogênese em humanos, por alterar a função da proteína e o seu nível de expressão (TETLOW *et al.*, 2004). É sabido que hormônios os esteróides estrógeno e progesterona estão diretamente relacionados ao câncer de mama em mulheres e testosterona e estradiol estão diretamente relacionados ao tumor de próstata em homens (UKRAINTSEVA *et al.*, 2007).

A presença de receptores hormonais para estrógeno e progesterona em tumores mamários em cães sugere forte envolvimento hormonal na doença. Ainda, é sabido que tumores pouco diferenciados apresentam menor concentração de receptores hormonais (SARTIN *et al.*, 1992), o que sugere que os hormônios influenciam a diferenciação do tumor. O cão é o modelo experimental para estudo de câncer de próstata desde os anos 50, pelo fato de desenvolver a neoplasia espontaneamente, assim como os humanos (WATERS & WILDASIN, 2006). No entanto a incidência do tumor parece maior em humanos do que em cães (WEAVER *et al.*, 1981; INCA, 2008). Tal diferença na incidência pode ser atribuída a orquiectomia precoce usualmente realizada em cães em várias partes do mundo (TESKE *et al.*, 2002).

Há poucos relatos na literatura sobre a importância das enzimas de fase II na metabolização de quimioterápicos e de carcinógenos em cães. Hanhn *et al.* (1999) verificaram menores taxas de resposta a tratamento quimioterápico para linfoma em cães com alta concentração plasmática de GSTs, sugerindo que diferentes genótipos dos genes codificadores de GSTs sejam responsáveis por metabolismo variável de quimioterápicos. Como esses genes também inativam carcinógenos, podemos inferir que o metabolismo de carcinógenos em cães seja também variável e dependente de genótipos distintos dos genes.

Não há estudos que caracterizem as frequências dos genótipos distintos do gene *GSTA3* em cães. Em uma única descrição obtida na análise de poucos animais (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), os cães apresentaram um nucleotídeo citosina ao invés de um adenina na posição 211 do gene *GSTA3*.

Devido à alta homologia nessa porção do genoma em humanos e cães, nós inferimos que o gene pudesse ser polimórfico também em cães. Entretanto, a presença apenas do genótipo homozigoto variante CC em todos os cães incluídos em nosso estudo, indica que o gene não é polimórfico em cães e que o alelo que é considerado variante para os humanos é o padrão de normalidade para os animais. Como o genótipo está associado à menor detoxificação de carcinógenos, é possível que constitua ao menos uma explicação plausível para a alta susceptibilidade para câncer em cães. Também não temos conhecimento da existência de estudos caso-controle sobre a influência desses genótipos no risco de ocorrência de câncer em animais de diferentes raças.

Inicialmente cães foram utilizados para estudos com terapias diversas (HUANG *et al.*, 2004; LAMB *et al.*, 2005; CHUANG *et al.*, 2006). É possível também que contribuam para a compreensão do papel de genes polimórficos, envolvidos com o metabolismo de carcinógenos, endógenos e exógenos, na origem de tumores.

CONCLUSÕES

Nosso estudo revela que há diferença significativa em relação à frequência dos genótipos do polimorfismo C1117T do gene *CYP1A2* em cães de raças distintas. O genótipo homozigoto selvagem é mais freqüente em cães de raça pura, especificamente em boxers, comparados a cães SRD. Não observamos em nosso estudo, variação de genótipo do gene *GSTA3* no locus I71L, ou seja, todos os animais apresentaram o genótipo homozigoto variante. Estes dados poderão servir de base para a compreensão das diferenças de efeitos de medicamentos e de incidência de determinadas neoplasias em diferentes grupos raciais de cães.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALI-OSMAN F, AKANDE O, ANTOUN G, MAO JX, BUOLAMWINI J. Molecular cloning, characterization, and expression in Escherichia coli of full-length cDNAs of three human glutathione S-transferase Pi gene variants. Evidence for differential catalytic activity of the encoded proteins. J Biol Chem 1997;272(15):1004-12.

American Cancer Society. Cancer facts and figures. Atlanta, USA, 2009. (<http://www.cancer.org>).

American Pet Products Manufacturing Association, Inc., Data, 2009. (http://www.appma.org/press_releasedetail.asp?id=52).

ARRUDA VR, LIMA CSP, GRIGNOLI, CRE, MELO, MB, LORAND-METZE, I, ALBERTO, FL, et al. Increased risk for acute myeloid leukaemia in individuals with glutathione S-transferase Mu 1 (GSTM1) and Tetha 1 (GSTT1) Gene Defects. Eur J Haematol 2001;66(6):383-8.

AZUMA R, KOMURO M, KAWAGUCHI Y, OKUDAIRA K, HAYASHI M, KIWADA H. Comparative Analysis of in vitro and in vivo pharmacokinetics parameters related of individual variability of GTS-21 in canine. Drug Metab Pharmacokinet 2002;17:75-82.

BACHSCHMID M, SCHILDKNECHT S, ULLRICH V. Redox regulation of vascular prostanoid synthesis by the nitric oxide-superoxide system. Biochem Biophys Res Commun 2005;338:536-42.

BAKER-GABB M, HUNT GB, FRANCE MP. Soft tissue sarcomas and mast cell tumours in dogs; clinical behaviour and response to surgery. Aust Vet J 2003;81:732-38.

BEIGUELMAN B. Dinâmica dos Genes nas Famílias e Populações. 2.ed. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética;1995,1-472.

BELAND FA, KADLUBAR FF. Carcinogenesis and Mutagenesis. In: Cooper CS, Grover PL. Handbook of Experimental Pharmacology. Heidelberg: Springer-Verlag; 1990;94/1: 267-325.

BENFIELD JR, HAMMOND WG. Bronchial and pulmonary carcinogenesis at focal sites in dogs and hamsters. *Cancer Res* 1992; 52(9 Suppl):2687-93.

BERSCHNEIDER HM. Alternative diets. *Clin Tech Small Anim Pract* 2002;17(1):1-5.

BLACKBURN AC, TZENG HF, ANDERS MW, BOARD PG. Discovery of a Functional Polymorphism in Human Glutathione Transferase Zeta by Expressed Sequence Tag Database Analysis. *Pharmacogenetics* 2000;10:49-57.

BUNCH, SE Hepatotoxicity associated with pharmacologic agents in dogs and cats. In: LEIB, M. S. *The Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice. Gastroenterology: The 1990's*. Philadelphia : Saunders, 1993; 23(3):659-70.

BUTERS JT, MAHADEVAN B, QUINTANILLA-MARTINEZ L, GONZALEZ FJ, GREIM H, BAIRD WM, et al. Cytochrome P450 1B1 determines susceptibility to dibenzo[a,l]pyrene-induced tumor formation. *Chem Res Toxicol* 2002;15(9):1127-35.

CARTWRIGHT R, BRINCKER H, CARLI P, et al. The rise in incidence of lymphomas in Europe 1985–1992. *Eur J Cancer* 1999;35:627-33.

CASE LP, CAREY DP, HIRAKAWA DA. Desenvolvimento e tratamento da obesidade. In: Case LP, Carey DP, Hirakawa DA, *Nutrição Canina e Felina*. Madrid: HARCOURT BRACE; 1998; 257.

CAVALIERI EL, ROGAN EG, LI KM, TODOROVIC R, ARIESE F, JANKOWIAK R, et al. Identification and quantification of the depurinating DNA adducts formed in mouse skin treated with dibenzo[a,l]pyrene (DB[a,l]P) or its metabolites and in rat mammary gland treated with DB[a,l]P. *Chem Res Toxicol* 2005;18(6):976-83.

CHASSAGNE-CLEMENT C, BLAY J, TREILLEUX I, et al. Epidémiologie des lymphomes malins non-hodgkiniens: Données actualisées. Bull Cancer 1999;86:529-36.

CHEN H, SANDLER DP, TAYLOR JA, SHORE DL, LIU E, BLOOMFIELD CD, et al. Increased risk for myelodysplastic syndromes in individuals with glutathione S-transferase theta 1 (GSTT1) gene defect. Lancet 1996;347(8997):295-97.

CHUANG YC, TU CH, HUANG CC, LIN HJ, CHIANG PH, YOSHIMURA N, et al. Intraprostatic injection of botulinum toxin type-A relieves bladder outlet obstruction in human and induces prostate apoptosis in dogs. BMC Urol 2006;6:12.

CLAPPER ML, HOFFMAN SJ, CARP N, WATTS P, SEESTALLER LM, WEESE JL, et al. Contribution of patient history to the glutathione S-transferase activity of human lung, breast and colon tissue. Carcinogenesis 1991;12(10):1957-61.

COLES B, NOWELL SA, MACLEOD SL, SWEENEY C, LANG NP, KADLUBAR FF. The role of human glutathione S-transferases (hGSTs) in the detoxification of the food-derived carcinogen metabolite N-acetoxy-PhIP, and the effect of a polymorphism in hGSTA1 on colorectal cancer risk. Mutat Res 2001;482(1-2):3-10.

COLES BF, KADLUBAR FF. Human alpha class glutathione S-transferases: genetic polymorphism, expression, and susceptibility to disease. Methods Enzymol 2005;401:9-42.

CONNEY AH. Induction of microsomal enzymes by foreign chemicals and carcinogenesis by polycyclic aromatic hydrocarbons. Cancer Res 1982;42(12):4875-917.

COTTON SC, SHARP L, LITTLE J, BROCKTON N. Glutathione S-transferase polymorphisms and colorectal cancer: a HuGE review. Am J Epidemiol 2000;151(1):7-32.

CRAIG LE. Cause of death in dogs according to breed: a necropsy survey of five breeds. J Am Anim Hosp Assoc 2001;37(5):438-43.

CREW KD, NEUGUT AL. Epidemiology of upper gastrointestinal malignancies. *Semin Oncol* 2004;31(4):450-64.

CRIBB AE, SPIELBERG SP, GRIFFIN GP. N4-hydroxylation of sulfamethoxazole by cytochrome P450 of the cytochrome P4502C subfamily and reduction of sulfamethoxazole hydroxylamine in human and rat hepatic microsomes. *Drug Metab Dispos* 1995; 23(3):406-14.

DANIELSON PB. The cytochrome P450 superfamily: biochemistry, evolution and drug metabolism in humans. *Curr Drug Metab* 2002;3(6):561-97.

DAVIES SE, PORTMANN BC. Drugs and toxins. In: WIGHT DGD. Liver, biliary tract and exocrine pancreas. Oxford: Bath, 1994;11:201-36.

DORN CR. The epidemiology of cancer in animals. *Calif Med* 1967;107(6):481-89.

DUNN SE, KARI FW, FRENCH J, LEININGER JR, TRAVLOS G, WILSON R, et al. Dietary restriction reduces insulin-like growth factor I levels, which modulates apoptosis, cell proliferation, and tumor progression in p53-deficient mice. *Cancer Res* 1997;57:4667-72.

EVANS WE, RELLING MV. Pharmacogenomics: translating functional genomics into rational therapeutics. *Science* 1999;286(5439):487-91.

FORMAN D. Review article: oesophago-gastric adenocarcinoma: an epidemiological perspective. *Aliment Pharmacol Ther* 2004;20(Suppl 5):55-60.

GASPARINI SS, LUNA SPL, CASSU RN, UIECHI E, CROCCI A . Anestesia epidural com ropivacaína, lidocaína ou a associação de lidocaína e xilazina em cães. Efeitos cardiorrespiratório e analgésico. *Ciência Rural* 2007;37:418-24.

GAVAZZA A, PRESCIUTTINI S, BARALE R, LUBAS G, GUGLIUCCI B. Association between canine malignant lymphoma, living in industrial areas, and use of chemicals by dog owners. *J Vet Intern Med* 2001;15(3):190-5.

GAYET C, BAILHACHE E, DUMON H, MARTIN L, SILIART B, NGUYEN P. Insulin resistance and changes in plasma concentration of TNFalpha, IGF1, and NEFA in dogs during weight gain and obesity. *J Anim Physiol Anim Nutr (Berl)* 2004;88(3-4):157-65.

GOLD LS, MANLEY NB, SLONE TH, WARD JM. Compendium of chemical carcinogens by target organ: results of chronic bioassays in rats, mice, hamsters, dogs, and monkeys. *Toxicol* 2001;29(6):639-52.

GOODERHAM NJ, MURRAY S, LYNCH AM, EDWARDS RJ, YADOLLAHI-FARSANI M, BRATT C, et al. Heterocyclic amines: evaluation of their role in diet associated human cancer. *Br J Clin Pharmacol* 1996;42(1):91-8.

GORDON I, PAOLONI M, MAZCKO C, KHANNA C. The Comparative Oncology Trials Consortium: using spontaneously occurring cancers in dogs to inform the cancer drug development pathway. *PLoS Med* 2009;6(10):e1000161.

GROPP FN, GREGER DL, MOREL C, SAUTER S, BLUM JW. Nuclear receptor and nuclear receptor target gene messenger ribonucleic acid levels at different sites of the gastrointestinal tract and in liver of healthy dogs. *J Anim Sci* 2006;84(10):2684-91.

GUENGERICH FP. Forging the links between metabolism and carcinogenesis. *Mutat Res* 2001;488(3):195-209.

GUENGERICH FP. Inhibition of human cytochrome P450 1A1-, 1A2-, and 1B1-mediated activation of procarcinogens to genotoxic metabolites by polycyclic aromatic hydrocarbons. *Chem Res Toxicol* 2006;19(2):288-94.

HAHN KA, BARNHILL MA, FREEMAN KP, SHOIEB AM. Detection and clinical significance of plasma glutathione-S-transferases in dogs with lymphoma. *In Vivo* 1999; 13(2):173-5.

HANSEN K, KHANNA C. Spontaneous and genetically engineered animal models; use in preclinical cancer drug development. *Eur J Cancer* 2004;40(6):858-80.

HAYES JD, PULFORD DJ. The glutathione S-transferase supergene family: regulation of GST and the contribution of the isoenzymes to cancer chemoprotection and drug resistance. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 1995;30(6):445-600.

HECHT SS. Tobacco smoke carcinogens and breast cancer. *Environ Mol Mutagen*. 2002; 39(2-3):119-26.

HENGSTLER JG, ARAND M, HERRERO ME, OESCH F. Polymorphisms of N-acetyltransferases, glutathione S-transferases, microsomal epoxide hydrolase and sulfotransferases: influence on cancer susceptibility. *Recent Results Cancer Res* 1998; 154:47-85.

HIGUCHI T, STELLA V. Pro Drugs as a novel Drug Delivery Systems, ACS, Washington, D.C, EUA, 1975.

HOVELL MF, IRVIN VL. The public health significance of ETS exposure to dogs and other pets. *Nicotine Tob Res* 2007;9(11):1067-9.

HUANG J, POWELL WC, KHODAVIRDI AC, WU J, MAKITA T, CARDIFF RD, et al. Prostatic intraepithelial neoplasia in mice with conditional disruption of the retinoid X receptor alpha allele in the prostate epithelium. *Cancer Res* 2002;62(16):4812-9.

HUEPER WC, WILLEY FH, WOLFE HDJ. *Ind Hyg Toxicol* 1938;20:46-84.

INSKIP A, ELEXPERU-CAMIRUAGA J, BUXTON N, DIAS PS, MACINTOSH J, CAMPBELL D, et al. Identification of polymorphism at the glutathione S-transferase, GSTM3 locus: evidence for linkage with GSTM1*A. *Biochem J* 1995;312(Pt 3):713-6.

ISHIOKA K, SOLIMAN MM, SAGAWA M, NAKADOMO F, SHIBATA H, HONJOH T, et al. Experimental and clinical studies on plasma leptin in obese dogs. *J Vet Med Sci* 2002; 64(4):349-53.

JOHANSSON AS, MANNERVIK B. Human glutathione transferase A3-3, a highly efficient catalyst of double-bond isomerization in the biosynthetic pathway of steroid hormones. *J Biol Chem* 2001;276(35):33061-5.

JOSEPHY PD, TAYLOR PL, VERVAET G, MANNERVIK B. Screening and characterization of variant Theta-class glutathione transferases catalyzing the activation of ethylene dibromide to a mutagen. *Environ Mol Mutagen* 2006;47(9):657-65.

KETTERER B. Protective role of glutathione transferases in mutagenesis and carcinogenesis. *Mutat Res* 1988;202:343-61.

KHANNA C, LINDBLAD-TOH K, VAIL D, LONDON C, BERGMAN P, BARBER L, et al. The dog as a cancer model. *Nat Biotechnol* 2006;24(9):1065-6.

KHANNA C, PREHN J, HAYDEN D, CASSADAY RD, CAYLOR J, JACOB S, et al. A randomized controlled trial of octreotide pamoate long-acting release and carboplatin versus carboplatin alone in dogs with naturally occurring osteosarcoma: evaluation of insulin-like growth factor suppression and chemotherapy. *Clin Cancer Res* 2002;8(7):2406-12.

KNIZE MG, SALMON CP, PAIS P, FELTON JS. Food heating and the formation of heterocyclic aromatic amine and polycyclic aromatic hydrocarbon mutagens/carcinogens. *Adv Exp Med Biol* 1999;459:179-93.

KOBAYASHI K, MIMURA N, FUJII H, MINAMI H, SASAKI Y, SHIMADA N, et al.. Role of human cytochrome P450 3A4 in metabolism of medroxyprogesterone acetate. *Clin Cancer Res* 2000;6(8):3297-303.

LUNA SPL, BASILIO AC, STEAGALL PVM, MACHADO LP, MOUTINHO FQ, TAKAHIRA RK, BRANDÃ, CVS. Evaluation of adverse effects of oral long-term administration of carprofen, etodolac, flunixin meglumine, ketoprofen and meloxicam in dogs. *American Journal of Veterinary Research* 2007;68:258-64.

LAMB DJ, ZHANG L. Challenges in prostate cancer research: animal models for nutritional studies of chemoprevention and disease progression. J Nutr 2005;135(12 Suppl): 3009S-15S.

LEE CH, KWEON OK. Mutations of p53 tumor suppressor gene in spontaneous canine mammary tumors. J Vet Sci 2002;3(4):321-5.

LINDBLAD-TOH K, WADE CM, MIKKELSEN TS, KARLSSON EK, JAFFE DB, KAMAL M, et al. Genome sequence, comparative analysis and haplotype structure of the domestic dog. Nature 2005;438(7069):803-19.

LUND EM, ARMSTRONG PJ, KIRK CA, KLAUSNER JS. Prevalence and risk factors for obesity in adult dogs from private US veterinary practices. International Journal of Applied Research in Veterinary Medicine 2006;4:177-86.

MATHAROO-BALL B, MILES AK, CREASER CS, BALL G, REES R. Serum biomarker profiling in cancer studies: a question of standardisation? Vet Comp Oncol 2008;6(4): 224-47.

MCILWAIN CC, TOWNSEND DM, TEW KD. Glutathione S-transferase polymorphisms: cancer incidence and therapy. Oncogene 2006; 25(11):1639-48.

MICHAUD DS, SPIEGELMAN D, CLINTON SK, RIMM EB, WILLETT WC, GIOVANNUCCI E. Prospective study of dietary supplements, macronutrients, micronutrients, and risk of bladder cancer in US men. Am J Epidemiol. 2000; 152(12):1145-53.

MICHEL KE. Unconventional diets for dogs and cats. Vet Clin North Am Small Anim Pract 2006;36(6):1269-81.

MILLER EC. Some current perspectives on chemical carcinogenesis in humans and experimental animals: Presidential Address. Cancer Res 1978;38(6):1479-96.

Ministério da Saúde do Brasil. Instituto Nacional do Câncer. Estimativas para incidência e mortalidade por câncer 2004. Rio de Janeiro, 2008 (<http://www.inca.gov.br>).

MISE M, HASHIZUME T, MATSUMOTO S, TERAUCHI Y, FUJII T. Identification of non-functional allelic variant of CYP1A2 in dogs. *Pharmacogenetics* 2004a;14(11):769-73.

MISE M, YADERA S, MATSUDA M, HASHIZUME T, MATSUMOTO S, TERAUCHI Y, et al. Polymorphic expression of CYP1A2 leading to interindividual variability in metabolism of a novel benzodiazepine receptor partial inverse agonist in dogs. *Drug Metab Dispos* 2004b;32(2):240-5.

MODIANO J, BREEN M, BURNETT R, et al. Distinct B-cell and T-cell lymphoproliferative disease prevalence among dog breeds indicate heritable risk. *Cancer Res* 2005;65: 5654-61.

MOORGHEN M, CAIRNS J, FORRESTER LM, HAYES JD, HALL A, CATTAN AR, et al. Enhanced expression of glutathione S-transferases in colorectal carcinoma compared to non-neoplastic mucosa. *Carcinogenesis* 1991;12(1):13-7.

MOREL F, SCHULZ WA, SIES H. Gene structure and regulation of expression of human glutathione S-transferases alpha. *Biol Chem Hoppe Seyler* 1994;375(10):641-9.

MOREL F, RAUCH C, COLES B, LE FERREC E, GUILLOUZO A. The human glutathione transferase alpha locus: genomic organization of the gene cluster and functional characterization of the genetic polymorphism in the hGSTA1 promoter. *Pharmacogenetics*. 2002;12(4):277-86.

MULLER A, IHORST G, MERTELSMANN R, et al. Epidemiology of non-Hodgkin's lymphoma (NHL): Trends, geographic distribution, and etiology. *Ann Hematol* 2005;84: 1-12

NAMBA H, MATSUO K, FAGIN JA. Clonal composition of benign and malignant human thyroid tumors. *J Clin Invest* 1990;86(1):120-5.

NASCIMENTO C, BRAZ JRC, CURI PR, VANE LA, CASTIGLIA YMM. Efeitos da Infusão Contínua do Propofol sobre a Função Renal do Cão. Estudo Comparativo com o Pentobarbital Sódico. Rev Bras Anesthesiol 1994; 44(3):163-70.

NASCIMENTO H, COY CS, TEORI MT, BOIN IF, GÓES JR, COSTA FF, LIMA CS. Possible influence of glutathione S-transferase GSTT1 null genotype on age of onset of sporadic colorectal adenocarcinoma. Dis Colon Rectum 2003;46(4):510-5.

NEBERT DW, RUSSELL DW. Clinical importance of the cytochromes P450. Lancet 2002; 360(9340):1155-62.

NEBERT DW, DALTON TP. The role of cytochrome P450 enzymes in endogenous signalling pathways and environmental carcinogenesis. Nat Rev Cancer 2006; 6(12): 947-60.

NELSON DR, KOYMANS L, KAMATAKI T, STEGEMAN JJ, FEYEREISEN R, WAXMAN DJ, et al. P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, accession numbers and nomenclature. Pharmacogenetics 1996;6(1):1-42.

NELSON DR, ZELDIN DC, HOFFMAN SM, MALTAIS LJ, WAIN HM, NEBERT DW. Comparison of cytochrome P450 (CYP) genes from the mouse and human genomes, including nomenclature recommendations for genes, pseudogenes and alternative-splice variants. Pharmacogenetics 2004;14(1):1-18.

NIMS RW, PROUGH RA, JONES CR, STOCKUS DL, DRAGNEV KH, THOMAS PE, et al. In vivo induction and in vitro inhibition of hepatic cytochrome P450 activity by the benzodiazepine anticonvulsants clonazepam and diazepam. Drug Metab Dispos 1997;25(6):750-6.

NING B, WANG C, MOREL F, NOWELL S, RATNASINGHE DL, CARTER W, et al. Human glutathione S-transferase A2 polymorphisms: variant expression, distribution in prostate cancer cases/controls and a novel form. Pharmacogenetics 2004;14(1):35-44.

NYBERG F, HOU SM, HEMMINKI K, LAMBERT B, PERSHAGEN G. Glutathione S-transferase mu1 and N-acetyltransferase 2 genetic polymorphisms and exposure to tobacco smoke in nonsmoking and smoking lung cancer patients and population controls. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1998;7(10):875-83.

OLSON PN. Using the canine genome to cure cancer and other diseases. *Theriogenology* 2007;68(3):378-81.

OMURA T, SATO R. A new cytochrome in liver microsomes. *J Biol Chem* 1962;237:1375-6.

ORTEGA MM, NASCIMENTO H, MELO MB, TEORI MT, COSTA FF, LIMA CS. Polymorphisms of glutathione S-transferase mu1 (GSTM1) and theta1 (GSTT1) genes in multiple myeloma. *Acta Haematol* 2003;109(2):108-9.

OSAWA Y, OSAWA KK, MIYAISHI A, HIGUCHI M, TSUTOU A, MATSUMURA S, et al. NAT2 and CYP1A2 polymorphisms and lung cancer risk in relation to smoking status. *Asian Pac J Cancer Prev* 2007;8(1):103-8.

OSÓRIO-COSTA F, ROCHA GZ, DIAS MM, CARVALHEIRA JB. Epidemiological and molecular mechanisms aspects linking obesity and cancer. *Arq Bras Endocrinol Metabol*. 2009;53(2):213-26.

PAES AC, MANGIA SH, FLAMINIO AP, LARA GHB, LISTONI FJP. Perfil de sensibilidade de bactérias isoladas de animais domésticos na região de Botucatu frente ao cloranfenicol e florfenicol. *Veterinária e Zootecnia* 2009;16:161-72.

PAOLONI M, KHANA C. Comparative oncology today. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 2007;37 (6):1023-32.

PASCUSI JM, VILAREM MJ. Inflammation and drug metabolism: NF-kappaB and the CAR and PXR xeno-receptors. *Med Sci (Paris)* 2008;24(3):301-5.

PASTOR M, CHALVET-MONFRAY K, MARCHAL T, KECK G, MAGNOL JP, FOURNEL-FLEURY C, PONCE FJ. Genetic and environmental risk indicators in canine non-Hodgkin's lymphomas: breed associations and geographic distribution of 608 cases diagnosed throughout France over 1 year. *Vet Intern Med*. 2009;23(2):301-10.

PAULSON SK, ENGEL L, REITZ B, BOLTEN S, BURTON EG, MAZIASZ TJ, et al. Evidence for polymorphism in the canine metabolism of the cyclooxygenase 2 inhibitor, celecoxib. *Drug Metab Dispos* 1999;27(10):1133-42.

PEMBLE S, SCHROEDER KR, SPENCER SR, MEYER DJ, HALLIER E, BOLT HM, et al. Human glutathione S-transferase theta (GSTT1): cDNA cloning and the characterization of a genetic polymorphism. *Biochem J* 1994;300(Pt 1):271-6.

PEREZ ALENZA D, RUTTEMAN GR, PEÑA L, BEYNEN AC, CUESTA P. Relation between habitual diet and canine mammary tumors in a case-control study. *J Vet Intern Med* 1998;12(3):132-9.

PEREZ ALENZA MD, PEÑA L, DEL CASTILLO N, NIETO AI J. Factors influencing the incidence and prognosis of canine mammary tumours *Small Anim Pract*. 2000;41(10):476.

PROSCHOWSKY HF, RUGBJERG H, ERSBOLL AK. Mortality of purebred and mixed-breed dogs in Denmark. *Prev Vet Med* 2003;58(1-2):63-74.

RAGHAVAN M, KNAPP DW, DAWSON MH, BONNEY PL, GLICKMAN LT. Topical flea and tick pesticides and the risk of transitional cell carcinoma of the urinary bladder in Scottish Terriers. *J Am Vet Med Assoc* 2004;225(3):389-94.

RIBOLI E, GONZÁLEZ CA, LÓPEZ-ABENTE G, ERREZOLA M, IZARZUGAZA I, ESCOLAR A, et al. Diet and bladder cancer in Spain: a multi-centre case-control study. *Int J Cancer* 1991;49(2):214-9.

ROZA MR, VIEGAS CA. The dog as a passive smoker: effects of exposure to environmental cigarette smoke on domestic dogs. *Nicotine Tob Res* 2007;9(11):1171-6.

RUSK A, COZZI E, STEBBINS M, VAIL D, GRAHAM J, VALLI V, et al. Cooperative activity of cytotoxic chemotherapy with antiangiogenic thrombospondin-I peptides, ABT-526 in pet dogs with relapsed lymphoma. *Clin Cancer Res* 2006;12(24):7456-64.

SALEHI F, DUNFIELD L, PHILLIPS KP, KREWSKI D, VANDERHYDEN BCJ. Risk factors for ovarian cancer: an overview with emphasis on hormonal factors. *Toxicol Environ Health B Crit Rev.* 2008;11(3-4):301-21.

SARGAN D. Haemangiosarcoma in German shepherd dogs. *Vet Rec* 2007;160(19):672.

SARTIN EA, BARNES S, KWAPIEN RP, WOLFE LG. Estrogen and progesterone receptor status of mammary carcinomas and correlation with clinical outcome in dogs. *Am J Vet Res* 1992;53(11):2196-200.

SCHLIENGER JL, LUCA F, VINZIO S, PRADIGNAC A. Obesity and cancer. *Rev Med Intern.* 2009;30(9):776-82.

SEIDEGARD J, VORACHEK WR, PERO RW, PEARSON WR. Hereditary differences in the expression of the human glutathione transferase active on trans-stilbene oxide are due to a gene deletion. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1988;85(19):7293-7.

SHIMADA T, MIMURA M, INOUE K, NAKAMURA S, ODA H, OHMORI S, YAMAZAKI H. Cytochrome P450-dependent drug oxidation activities in liver microsomes of various animal species including rats, guinea pigs, dogs, monkeys, and humans. *Arch Toxicol* 1997;71(6):401-8.

SHIMADA T, YAMAZAKI H, MIMURA M, INUI Y, GUENGERICH FP. Interindividual variations in human liver cytochrome P-450 enzymes involved in the oxidation of drugs, carcinogens and toxic chemicals: studies with liver microsomes of 30 Japanese and 30 Caucasians. *J Pharmacol Exp Ther* 1994;270(1):414-23.

SIMPSON ER. Genetic mutations resulting in loss of aromatase activity in humans and mice. *J Soc Gynecol Invest* 2000;7:S18-21.

SINAL CJ, TOHKIN M, MIYATA M, WARD JM, LAMBERT G, GONZALEZ FJ. Targeted disruption of the nuclear receptor FXR/BAR impairs bile acid and lipid homeostasis. *Cell* 2000;102:731-44.

SINHA R, GUSTAFSON DR, KULLDORFF M, WEN WQ, CERHAN JR, ZHENG W. 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine, a carcinogen in high-temperature-cooked meat, and breast cancer risk. *J Natl Cancer Inst* 2000;92:1352-4.

SLATTERY ML, KAMPMAN E, SAMOWITZ W, CAAN BJ, POTTER JD. Interplay between dietary inducers of GST and the GSTM-1 genotype in colon cancer. *Int J Cancer*. 2000; 87(5):728-33.

SPURR NK, GOUGH AC, STEVENSON K, WOLF CR. Msp-1 polymorphism detected with a cDNA probe for the P-450 I family on chromosome 15. *Nucleic Acids Res* 1987; 15(14):5901.

SOARES, T C S, MOTTA RG, PAES AC, LISTONI FJP. Perfil de Sensibilidade de Amostras de *Pasteurella multocida* e *Mannheimia haemolytica* Isoladas na Região de Botucatu, São paulo, Brasil, no Período de Janeiro de 2000 à Novembro de 2007. *Veterinária e Zootecnia* 2009;16:173-9.

STECK SE, HEBERT JR. GST polymorphism and excretion of heterocyclic aromatic amine and isothiocyanate metabolites after Brassica consumption. *Environ Mol Mutagen* 2009;50(3):238-46.

TALALAY P, FAHEY JW. Phytochemicals from cruciferous plants protect against cancer by modulating carcinogen metabolism. *J Nutr* 2001;131:3027S-33S.

TASAKI T, IWATA H, KAZUSAKA A, FUJITA S. Regio- and Stereoselectivity in Propranolol Metabolism by Dog Liver Microsomes and the Expressed Dog CYP2D151. *J Biochem* 1998;123:747-51.

TENMIZU D, ENDO Y, NOGUCHI K, KAMIMURA H. Identification of the novel canine CYP1A2 1117 C > T SNP causing protein deletion. *Xenobiotica* 2004;34(9):835-46.

TENMIZU D, NOGUCHI K, KAMIMURA H, OHTANI H, SAWADA Y. The canine CYP1A2 deficiency polymorphism dramatically affects the pharmacokinetics of 4-cyclohexyl-1-ethyl-7-methylpyrido[2,3-D]-pyrimidine-2-(1H)-one (YM-64227), a phosphodiesterase type 4 inhibitor. *Drug Metab Dispos* 2006;34(5):800-6.

TESKE E, NAAN EC, VAN DIJK EM, VAN GARDEREN E, SCHALKEN JA. Canine prostate carcinoma: epidemiological evidence of an increased risk in castrated dogs. *Mol Cell Endocrinol* 2002;197(1-2):251-5.

TETLOW N, COGGAN M, CASAROTTO MG, BOARD PG. Functional polymorphism of human glutathione transferase A3: effects on xenobiotic metabolism and steroid biosynthesis. *Pharmacogenetics* 2004;14(10):657-63.

The National Center for Biotechnology Information (NCBI), NCBI HomePage, (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

TILTMAN AJ, ALI H. Distribution of alpha glutathione S-transferase in ovarian neoplasms: an immunohistochemical study. *Histopathology* 2001;39:266-72.

TOWNSEND D, TEW K. Cancer drugs, genetic variation and the glutathione-S-transferase gene family. *Am J Pharmacogenomics* 2003;3(3):157-72.

UCHIDA T, KOMORI M, KITADA M, KAMATAKI T. Isolation of cDNAs coding for three different forms of liver microsomal cytochrome P-450 from polychlorinated biphenyl-treated beagle dogs, *Molecular Pharmacology* 1990;38:644-51.

UKRAINTSEVA SV, ARBEEV KG, YASHIN AL. Epidemiology of Hormone-Associated Cancers as a Reflection of Age. In: Lev M. Berstein and Richard J. Santen (eds.). *Innovative Endocrinology of Cancer*. Landes Bioscience; 2007.

VAN DEN BRANDT PA, SPIEGELMAN D, YAUN SS, ADAMI HO, BEESON L, FOLSOM AR, et al. Pooled analysis of prospective cohort studies on height, weight, and breast cancer risk. *Am J Epidemiol* 2000;152(6):514-27.

VANAMALA J, TARVER CC, MURANO PS. Obesity-enhanced colon cancer: functional food compounds and their mechanisms of action. *Curr Cancer Drug Targets* 2008;8(7):611-33.

VERHOEVEN DT, VERHAGEN H, GOLDBOHN RA, VAN DEN BRANDT PA, VAN POPPEL G. A review of mechanisms underlying anticarcinogenicity by brassica vegetables. *Chem Biol Interact* 1997;103:79-129.

VINEIS P, CAPORASO N. Tobacco and cancer: epidemiology and the laboratory. *Environ Health Perspect* 1995;103(2):156-60.

VINEIS P, MALATS N, LANG M, D'ERICO A, CAPORASO N et al. Metabolic polymorphism and susceptibility to cancer, 1^a ed. *International Research for Research on Cancer*, Lyon, France. pp.1-510,1999.

VINEIS P. Individual susceptibility to carcinogens. *Oncogene* 2004;23(38):6477-83.

VIRANIA A, MAILISB ACE, SHAPIROA LE, SHEARA NH. Interacciones medicamentosas en la farmacoterapia del dolor neuropático humano. *Rev Soc Esp Dolor* 1999;6:102-15.

WANG B, SANCHEZ RI, FRANKLIN RB, EVANS DC, HUSKEY SE. The involvement of CYP3A4 and CYP2C9 in the metabolism of 17 alpha-ethinylestradiol. *Drug Metab Dispos* 2004;32:1209-12.

WANG XJ, YUAN SL, LU Q, LU YR, ZHANG J, LIU Y, et al. Potential involvement of leptin in carcinogenesis of hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* 2004;10(17):2478-81.

WARD LS. Genética molecular do câncer: implicações no câncer de tiróide. *Rev Bras Ci Terap* 1997;23(6):212-8.

WATANABE T, OHASHI Y, KOSAKA T, ARAKAWA S, SHIBAYA Y, YAMOTO T, et al. Expression of the theta class GST isozyme, YdfYdf, in low GST dogs. Arch Toxicol 2006; 80(5):250-7.

WATERS JD, WILDASIN K. Cancer Clues from Pet Dogs. Scientific American. December 2006; p 94-101 (<http://ccr.cancer.gov/resources/cop/8-ScientificAmerican.pdf>).

WEAVER AD. Fifteen cases of prostatic carcinoma in the dog. Vet Rec 1981; 25;109(4):71-5.

WEETH LP, FASCETTI AJ, KASS PH, SUTER SE, SANTOS AM, DELANEY SJ. Prevalence of obese dogs in a population of dogs with cancer. Am J Vet Res 2007; 68(4):389-98.

WEI EK, GIOVANNUCCI E, WU K, ROSNER B, FUCHS CS, WILLETT WC, et al. Comparison of risk factors for colon and rectal cancer. Int J Cancer 2004;108(3):433-42.

WENZLAFF AS, COTE ML, BOCK CH, LAND SJ. GSTM1, GSTT1 and GSTP1 polymorphisms, environmental tobacco smoke exposure and risk of lung cancer among never smokers: a population-based study. Carcinogenesis 2005; 26(2):395-401.

WILSON D. Lung fibrosis and lung cancer incidence in beagle dogs that inhaled ²³⁸PuO₂ or ²³⁹PuO₂. Health Phys 2009;96(2):175-85.

WITHROW SJ, MACEWEN EG. Why worry about cancer in pets? In: Small Animal Clinical Oncology. 3.ed. Saunders 2008;1-3.

WOODHEAD JL, FALLON R, FIGUERED H, LONGDALE J, MALCOM AD. Alternative methodology of gene diagnosis in human. In: KE Davies (ed.). Genetic Diseases: A Practical Approach. Oxford: IRL Press;1986;51-64.

WYNALDA MA, HUTZLER JM, KOETS MD, PODOLL T, WIENKERS LC. In vitro metabolism of clindamycin in human liver and intestinal microsomes. *Drug Metab Dispos* 2003;31(7):878-87.

YAMAGUTI GG, LOURENÇO GJ, COSTA FF, LIMA CS. High risk of 'de novo' acute myeloid leukaemia in individuals with cytochrome P450 A1 (CYP1A1) and NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 (NQO1) gene defects. *Eur J Haematol* 2009;83:270-2.

YOSHIDA K, OSAWA K, KASAHARA M, MIYAISHI A, NAKANISHI K, HAYAMIZU S, et al. Association of CYP1A1, CYP1A2, GSTM1 and NAT2 gene polymorphisms with colorectal cancer and smoking. *Asian Pac J Cancer Prev* 2007;8(3):438-44.

ZANGER UM, TURPEINEN M, KLEIN K, SCHWAB M. Functional pharmacogenetics/genomics of human cytochromes P450 involved in drug biotransformation. *Anal Bioanal Chem* 2008;392(6):1093-108.

ZHANG H, AHMADI A, ARBMAN G, ZDOLSEK J, CARSTENSEN J, NORDENSKJÖLD B, et al. Glutathione S-transferase T1 and M1 genotypes in normal mucosa, transitional mucosa and colorectal adenocarcinoma. *Int J Cancer* 1999;84(2):135-8.

ANEXOS

Critérios da Sociedade Brasileira de Cinofilia

Boxer

O boxer ideal é um cão de tamanho médio, de construção quadrada, de boa substância, com dorso curto, membros fortes e pelagem curta e acamada. Sua musculatura bem desenvolvida deve ser plástica, rija e de aparência uniforme sob a pele estirada. Seus movimentos devem denotar energia. Sua movimentação é firme porém elástica, a passada é livre com boa cobertura de solo, o porte orgulhoso.

Desenvolvido para servir como cão de guarda, trabalho e companhia, deve combinar resistência e agilidade com elegância e estilo. Sua expressão é alerta e o temperamento é firme e tratável. A cabeça esculpida confere ao boxer uma estampa individual única. Ela deve estar em proporção correta com o corpo. O focinho largo, rombudo é a característica marcante e deve ser atribuído grande valor à sua forma e balanceamento com crânio corretos. No julgamento do boxer deve ser dada fundamental importância à aparência geral para a qual uma cor atraente e modos impressionantes contribuem. Depois vem o balanceamento geral com atenção especial dada para a cabeça após o que os componentes individuais do corpo devem ser examinados para a avaliação da sua construção correta e a eficiência da sua movimentação.

Tamanho, proporção e substância

Machos adultos apresentam 57,15cm a 63,5cm (22 1/2' a 25'); fêmeas de 53,34cm a 59,69cm (21' a 23 1/2') de altura medidos na cernelha. De preferência, os machos não devem estar abaixo do mínimo, nem as fêmeas acima do máximo; entretanto, deve ser dada importância maior ao balanceamento e qualidade do exemplar já que não há desqualificação pelo tamanho.

O corpo visto de perfil é de proporção quadrada na qual a linha horizontal, da parte anterior do antepeito até a projeção posterior da coxa, deve ser igual a uma linha vertical que desce da parte superior da cernelha ao chão. Forte com musculatura bem balanceada. Machos de ossatura mais desenvolvida que as fêmeas.

Cabeça

A beleza da cabeça depende da proporção harmoniosa do focinho em relação ao crânio. O focinho rombudo mede um terço (1/3) do comprimento da cabeça do occipital à ponta do nariz e dois terços (2/3) da largura do crânio. A cabeça deve ser limpa, sem apresentar rugas profundas (enrugada). Rugas aparecem sobre a testa, tipicamente, quando as orelhas estão eretas e dobras são sempre presentes partindo da margem inferior do stop descendo por ambos os lados do focinho.

Expressão

Inteligente e alerta.

Olhos

Os olhos são de cor marrom-escuro nem muito pequenos, nem protrusos ou muito profundos. Seu modo de refletir o caráter combinado com as rugas da testa dá à cabeça do boxer sua qualidade de expressividade única.

Orelhas

Orelhas inseridas no ponto mais alto das laterais do crânio são cortadas, corte um pouco longo e afilando, eretas quando em alerta.

Crânio

O topo do crânio é levemente arqueado e não é nem arredondado, chato ou excessivamente largo, e o occipital não deve ser muito pronunciado. A testa apresenta uma ligeira depressão entre os olhos e forma com a linha superior do focinho um stop marcado. As bochechas devem ser relativamente achatadas e não salientes (bochechudo) mantendo as linhas regulares do crânio e devem afilar em direção ao focinho numa leve curva graciosa.

Focinho

O focinho, proporcionalmente desenvolvido em comprimento, largura e profundidade, tem o seu formato influenciado primeiro, pela formação de ambas as maxilas, segundo, pela colocação dos dentes, e terceiro pela textura dos lábios. A parte superior do focinho não deve ser descendente (focinho caído), nem deve ser côncava (focinho em prato), entretanto a ponta do nariz deve estar colocada um pouco mais alta do que a raiz do focinho.

Nariz

O nariz deve ser largo e preto.

Maxilar superior

Maxilar superior é largo onde se junta ao crânio e mantém essa largura, exceto por um afilamento muito ligeiro na frente. Os lábios os quais completam a formação do focinho, na frente devem encontrar-se de maneira uniforme. O lábio superior é grosso e almofadado, preenchendo o espaço frontal criado pela projeção da mandíbula, e lateralmente é apoiado pelos caninos da mandíbula. Por essa razão, esses caninos devem estar bem separados e ser de bom comprimento de forma que a superfície anterior do focinho seja larga e quadrada e, quando vista de lado, apresente uma moderada retração do nariz. O queixo deve ser perceptível tanto visto de lado como de frente.

Mordedura

O boxer é prógnata, portanto a mandíbula se projeta adiante do maxilar superior e se curva ligeiramente para cima. Os dentes incisivos da mandíbula estão em linha reta, com os caninos, de preferência, elevando-se na mesma para conceder à mandíbula a maior largura possível. A linha dos incisivos do maxilar superior é ligeiramente convexa com os incisivos cantos superiores se acomodando encaixados atrás dos caninos inferiores de cada lado.

Pescoço, linha superior, corpo

O pescoço deve ser redondo, de grande comprimento, musculoso e limpo, sem excessiva pele solta (barbelas). O pescoço tem uma nuca nitidamente marcada com um arco elegante fundindo-se de maneira suave aos ombros. A linha superior deve ser uniforme, firme e levemente inclinada

O peito é de largura razoável e o antepeito bem definido e visível de lado. O esterno é profundo atingindo em baixo até os cotovelos; a profundidade do corpo no ponto mais baixo do esterno igual à metade da altura do cão na cernelha. As costelas se estendem bem para trás são bem arqueadas, porém não em formato de barril. A linha superior é curta, reta e musculosa e conecta firmemente a cernelha ao trem posterior. O lombo é curto e musculoso. A linha inferior no ventre é ligeiramente esgalgada juntando-se ao posterior em uma curva graciosa. A garupa é ligeiramente inclinada, plana e larga. A cauda é inserida alta, cortada e portada para cima. A pélvis é longa e larga, especialmente nas fêmeas.

Membros anteriores

Os ombros são longos e inclinados, bem acamados e não excessivamente cobertos por músculos (carregados). O braço é longo quase formando um ângulo reto com a escápula. Os cotovelos não devem pressionar muito as paredes do tórax nem afastarem-se, visivelmente, fora delas. As pernas da frente são longas, retas e firmemente musculadas e quando vistas de frente paralelas uma à outra. O metacarpo é forte e destacado, ligeiramente inclinado, porém ficando quase perpendicular ao chão. Os quintos dedos podem ser removidos. Os pés devem ser compactos sem desviar para dentro nem para fora, com dedos bem arqueados.

Membros posteriores

Os posteriores são pesadamente musculosos com ângulos em balanceamento com os dos anteriores. As coxas são largas e curvas, a musculatura da parte posterior da coxa é rija e fortemente desenvolvida. Coxas longas. Pernas bem anguladas no joelho com a junta dos jarretes, bem baixos, claramente definida. Vistas por trás as pernas posteriores devem ser retas, com a junta dos jarretes não se desviando nem para dentro nem para fora. Visto de lado o jarrete (metatarso) deve ser praticamente perpendicular ao chão, com uma ligeira inclinação para trás permissível. O metatarso deve ser curto, liso e forte. O boxer não tem quintos dedos posteriores.

Pelagem

A pelagem deve ser curta, brilhante, acamada e aderente ao corpo. As cores são fulvo e tigrado. Fulvo em vários tons de canela claro ao mogno escuro. O tigrado varia desde esparsas, porém claramente definidas listras pretas em um fundo fulvo até uma pesada concentração de listras pretas através da qual, apesar de clara, a essencial cor de fundo fulva, mal aparece, o que pode criar a imagem de um "tigrado reverso".

Marcas brancas devem estar distribuídas de forma tal que realcem a aparência do cão, porém não devem exceder um terço (1/3) do total da pelagem. Não são desejáveis nos flancos ou na parte de trás do torso propriamente dito. No focinho o branco pode substituir parte da, de outra forma essencial, máscara preta, podendo se estender por entre os olhos, mas não deve ser excessiva para não distorcer a verdadeira expressão do boxer.

Caráter e temperamento

Estes são de importância fundamental no boxer. Instintivamente um cão de guarda com grande "acuidade auditiva", seu porte é alerta, digno e auto-confiante. Nas pistas de Exposição seu comportamento deve demonstrar uma animação contida. Com a família e amigos seu temperamento é fundamentalmente brincalhão e ainda paciente e estóico com as crianças. Circunspecto e cauteloso com estranhos, ele demonstra curiosidade, mas o que é mais importante, coragem temerária se ameaçado. Contudo, ele responde prontamente a aproximações amistosas quando se apresentam sinceras. Sua inteligência, afeição leal e docilidade para o aprendizado fazem-no um companheiro altamente desejável. Boxer de qualquer outra cor que não o fulvo ou o tigrado e animais com um total de marcas brancas excedendo um terço do total da pelagem.

Faltas

Crânio muito largo, bochechas excessivas, rugas muito profundas na testa (enrugado) ou total ausência (liso), lábios excessivamente pendulosos, focinho muito leve para o crânio (pontudo), excesso de prognatismo, dentes ou língua aparecendo com a boca fechada. Olhos perceptivelmente mais claros do que a cor de fundo da pelagem.

Pescoço curto pesado. Peito muito largo, muito estreito ou pendendo por entre os ombros. Falta de antepeito. Ventre distendido. Caixa torácica de costelas achatadas. Lombo longo ou estreito, ou estreito, união frágil com a garupa. Garupa caída. Mais alto no posterior do que na frente. Ombros soltos ou carregados. Cotovelos para dentro ou para fora.

Coxas finas ou sobrecarregadas. Jarrete com excesso de angulação (jarrete de foice). Posteriores muito embaixo ou muito para trás do corpo. Marcas brancas não atraentes ou mal localizadas. Movimentação saltitante ou ineficiente. Falta de uniformidade na movimentação.

As angulações anteriores e posteriores corretas, vistas de lado se manifestam numa movimentação facilmente eficaz, com a linha superior em nível e boa cobertura de solo, com propulsão poderosa emanando de um posterior que trabalha livremente. Embora os anteriores não contribuam com a força propelente o alcance adequado deve estar evidente para evitar interferência dos anteriores com os posteriores, sobre passo, movimentação lateral (andar de caranguejo). Vistos de frente os ombros devem permanecer em boa posição e os cotovelos não devem se abrir para fora. As pernas ficam paralelas enquanto a passo, o rastro se estreita na proporção do aumento da velocidade, depois as pernas vão para debaixo do corpo, porém nunca devem se cruzar. A linha que vai do ombro à perna deve permanecer reta, embora não necessariamente perpendicular ao chão. Vista por trás a garupa do boxer não deve rebolar. Os pés de trás devem escavar o solo e trilhar em alinhamento relativo com os da frente. Novamente, conforme aumenta a velocidade, os rastros traseiros normalmente largos, vão se tornando mais estreitos.

Desqualificações

Desqualificações boxer de qualquer outra cor que não fulvo ou tigrado. Marcas brancas excedendo um terço (1/3) da cor total da a pelagem.

Rotweiler

O rottweiler ideal é um cão de tamanho médio para grande, robusto e poderoso; preto com marcação ferrugem claramente definida. Sua construção compacta e substanciosa denota grande força, agilidade e resistência. Os machos são caracteristicamente mais pesados em toda a parte do que as fêmeas com esqueleto maior e ossatura mais pesada. As fêmeas são claramente femininas mas sem fragilidade de substância ou de estrutura.

Tamanho, proporção e substância

Machos de 61 cm a 68,5 cm (24' a 27'). Fêmeas de 56 cm a 63,5 cm (22' a 25') sendo a média de altura ideal para cada sexo. A proporção correta é de primordial importância, contanto que o tamanho esteja dentro da extensão do padrão. O comprimento do corpo da ponta do esterno até a projeção mais posterior da garupa, é ligeiramente maior que a altura do cão na cernelha, a proporção mais desejável da altura em relação ao comprimento sendo de 9 para 10. O rottweiler não é nem grosseiro nem estreito com corpo pouco profundo faltando ossatura em relação ao tamanho. A profundidade do tórax é aproximadamente 50% da altura do cão seus ossos e massa muscular devem ser suficientes para balancear sua construção, conferindo uma aparência compacta e muito poderosa.

Faltas

Falta de proporção, abaixo do tamanho, inversão das características sexuais (machos afeminados e fêmeas masculinizadas).

Cabeça

A Cabeça deve ser de comprimento médio, larga entre as orelhas; a linha da testa vista de perfil é moderadamente arqueada; o arco zigomático e o stop bem desenvolvido com maxilar superior e mandíbula fortes e largos. A proporção desejada entre o crânio e o focinho é 3 para 2. Testa seca é preferida, entretanto algumas rugas podem ocorrer quando o cão está alerta.

Expressão

A expressão é nobre, alerta e auto confiante.

Olhos

Olhos de tamanho médio, em formato de amêndoa com pálpebras bem ajustadas, de inserção moderadamente profunda, nem protrusos nem afundados. A cor desejável é um marrom-escuro uniforme.

Orelhas

As orelhas são de tamanho médio, pendentes, de formato triangular; quando portadas em atenção as orelhas estão em nível com o topo do crânio e aparentam alargá-lo. As orelhas devem estar inseridas bem afastadas com o bordo interno situado firmemente contra a cabeça e terminando aproximadamente no meio do arco zigomático.

Focinho

A cana nasal é reta, larga na base afinando ligeiramente em direção à ponta. A terminação do focinho é larga com queixo bem desenvolvido. O nariz é largo, um tanto arredondado e sempre preto. Lábios são sempre pretos, comissuras fechadas; é preferível que o pigmento interno da boca seja escuro.

Mordedura e dentição

Dentes em número de 42 (20 em cima e 22 em baixo) fortes, situados corretamente e encontrando-se numa mordedura em tesoura - incisivos inferiores tocando a face interna dos incisivos superiores.

Pescoço, linha superior e corpo

O pescoço deve ser bem musculoso, moderadamente longo, ligeiramente arqueado e sem pele solta. A linha superior é firme e em nível estendendo-se em uma linha reta desde atrás da cernelha até a garupa. A linha superior permanece horizontal ao chão enquanto o cão se move ou fica parado.

O tórax é espaçoso, largo e profundo, atingindo o cotovelo, com antepeito bem pronunciado e costelas ovais bem arqueadas. O dorso é reto e forte. O lombo é curto, profundo e bem musculoso. A garupa é larga de comprimento médio e apenas ligeiramente inclinado. A linha inferior de um rottweiler maduro é ligeiramente esgalgada. Os machos deverão ter os dois testículos normais apropriadamente descidos no escroto.

Cauda

Cauda cortada curta, junto ao corpo, deixando-se uma ou duas vértebras. A inserção da cauda é mais importante do que o comprimento. Apropriadamente inserida ela dá a impressão de um prolongamento da linha superior; portada ligeiramente acima da horizontal quando o cão está excitado ou em movimentação.

Membros anteriores

A escápula é comprida e bem inclinada para trás. O braço de igual comprimento que a escápula, colocando assim os cotovelos bem embaixo do corpo. As distâncias da cernelha ao cotovelo e a do cotovelo ao chão são iguais. As pernas são fortemente desenvolvidas com ossos retos e pesados, e não estão colocadas muito juntas. Os metacarpos são fortes, elásticos e quase perpendiculares ao solo. Pés são redondos e compactos com dedos bem arqueados, não se virando nem para dentro nem para fora. Os coxins palmares são grossos e duros. As unhas curtas, fortes e pretas. Quintos dedos podem ser removidos.

Membros posteriores

Angulações posteriores balanceadas com a dos anteriores. A coxa é razoavelmente longa, muito larga e bem musculosa. A junta do joelho é bem torneada. A perna de trás é longa, larga e vigorosa com a ampla musculatura chegando até a forte junta do jarrete. Os jarretes são quase perpendiculares ao chão. Vistos por trás os posteriores são retos e afastados separados suficientemente para ajustarem-se a construção corpórea. As patas traseiras são um tanto mais longas do que as patas dos membros anteriores, não se virando nem para dentro nem para fora, igualmente compactos com dedos bem arqueados. Os coxins plantares são grossos e duros. As unhas curtas, fortes e pretas. Quintos dedos devem ser removidos.

Pelagem

O pelo externo é reto, rústico, denso, de comprimento médio e acamado. O sub-pelo deve estar presente no pescoço e coxas, porém a quantidade é influenciada pelas condições climáticas. O sub-pelo não deve aparecer através do pelo externo. O pelo é mais curto na cabeça, orelhas e pernas, e mais comprido nos culotes. O rottweiler é para ser exposto em condições naturais, sem nenhum corte (trimming).

Cor

Sempre preto com marcas de ferrugem à mogno. A demarcação entre o preto e o ferrugem deve ser claramente definido. As marcas devem se localizar como segue: uma mancha sobre cada olho; nas bochechas; como uma faixa junto cada lado do focinho mas não sobre a cana nasal; na garganta; marca triangular em ambos os lados da ponta do esterno; nas pernas da frente do carpo para baixo até os dedos; na parte interna das pernas de trás aparecendo na frente do joelho e se alargando para fora nas pernas de trás dos jarretes aos dedos, mas não eliminando completamente o preto nos jarretes; abaixo da cauda; marcas de lápis pretas sobre os dedos.

O sub-pelo é cinza, canela ou preto. Quantidade e localização das marcas ferrugem são importantes; elas não devem exceder 10% da cor do corpo.

Movimentação

O rottweiler é um trotador. Sua movimentação deve ser balanceada, harmoniosa, segura, poderosa e desembaraçada, com um potente alcance anterior e uma poderosa propulsão posterior. A locomoção é sem esforço, eficiente e com boa cobertura de solo. As pernas da frente e de trás não se torcem nem para dentro nem para fora e as marcas deixadas pelos pés de trás devem tocar as dos pés da frente e os posteriores são reciprocamente coordenados enquanto a linha superior permanece em nível, firme e relativamente imóvel. A medida em que a velocidade aumenta as pernas vão convergindo para baixo do corpo em direção à linha central.

Temperamento

O rottweiler é basicamente um cão calmo, confiante e corajoso com uma autoconfiança indiferente que não o leva a imediatas e indiscriminadas amizades. Reage pacientemente e com uma atitude de "deixe estar para ver como fica" em relação a influências no seu ambiente. Ele possui um desejo inato de proteger a casa e a família, e é um cão inteligente de extrema firmeza e adaptabilidade com um forte disposição para o trabalho fazendo-o especialmente ajustado como um cão de companhia, guardião e para todos os propósitos em geral. O comportamento do rottweiler nas pistas de exposição deve ser controlado, ajustado e adaptável, treinado para se submeter ao exame da boca, testículos, etc. Um cão indiferente ou reservado não deve ser penalizado porque isto reflete o reconhecido caráter da raça. Uma atitude agressiva ou beligerante em relação a outros cães não deve ser penalizada. O árbitro deve excluir da pista qualquer rottweiler assustado. Um cão deve ser julgado fundamentalmente assustado se, recusar a ficar parado para exame, escolhe-se para longe do árbitro. Um cão que na opinião do árbitro ameaça ou intimida ele ou ela, ou apresenta qualquer sinal que possa não garantir uma aproximação amistosa ou o exame pelo árbitro da maneira normal, deve ser excluído da pista. Um cão que, na opinião do juiz ataque qualquer pessoa na pista deve ser desqualificado.

Faltas

Olhos amarelos (olhos de rapina), olhos de cor ou tamanho diferentes, pálpebras sem cílios. Porte impróprio (com pregas) ou mantida para fora da cabeça e arco zigomático.

Falta total de pigmentação na boca (boca cor de rosa). Mordedura em torquês qualquer dente perdido. Pelo ondulado e ou aberto, excessivamente curto; falta total de sub-pelo; quaisquer cortes que alterem o comprimento natural do pelo.

Marcas cor de palha, excessivas, insuficientes ou fuliginosas; marcas ferrugem outras que as descritas acima; marcas brancas situadas em qualquer local (alguns pelos ferrugem ou brancos não constituem uma marca). Qualquer falta estrutural que destoe do cão de trabalho acima descrito deve ser penalizado de acordo com a descrição do desvio

Desqualificações

Entrópico ou Ectrópico.

Retrognatismo, prognatismo (quando os incisivos não se tocam ou se entrosam); boca torta; falta de dois ou mais dentes.

Machos com criptorquidia unilateral ou criptorquidia.

Pêlo longo.

Qualquer cor básica que não o preto; ausência de qualquer marca.

Pastor alemão

Um cão forte, compacto, quadrado e balanceado. Numa visão genérica, profusamente coberto por pelagem, mas não excessiva, atarracado, musculoso e robusto. Estas qualidades, combinadas com sua agilidade, fazem-no apto a atender as exigências das tarefas requeridas de um cão pastor ou boiadeiro. Por esse motivo robustez é da mais alta importância. Seu latido é alto com um som peculiar rouco, como se fosse emitido dentro de um pote de barro (pot-casse).

A primeira impressão de um bom pastor alemão é a de um animal forte, ágil, bem musculoso, alerta e cheio de vida. Ele é bem balanceado, com desenvolvimento harmônico dos anteriores e posteriores. O cão é mais comprido do que alto, de corpo profundo, e apresenta um perfil de curvas suaves no invés de ângulos. De aparência substanciosa e não adelgada, dando a sensação, tanto parado quanto em movimento, de aptidão muscular e agilidade sem ter qualquer aspecto desajeitado ou de preguiçoso. O cão ideal é estampado com um aspecto de qualidade e nobreza, difícil de ser definido, mas inequívoco quando esta presente. As características sexuais secundárias são fortemente marcadas e qualquer animal tem que dar a impressão inequívoca de masculinidade ou feminilidade, de acordo com o seu sexo.

Tamanho, proporção, substância

A altura desejável para os machos no ponto mais alto das escápulas é de 61 cm a 66 cm (24' a 26'); e para fêmeas 56 cm a 61 cm (22' a 24'). É mais comprido do que alto, e a proporção ideal é de 10 para 8,5. O comprimento é medido da ponta do esterno, até a proeminência posterior da pelve a ponta do ísquio. A desejável proporção alongada não é proveniente de uma linha superior longa, mas da prevalência do comprimento geral em relação à altura o que é alcançado pelas medidas do antebraço, da escápula e do trem posterior, quando vistos de perfil.

Cabeça

A cabeça é nobre, bem cinzelada, forte sem ser grosseira, mas acima de tudo, não refinada, e em proporção ao corpo. A cabeça do macho é distintivamente masculina e da fêmea distintivamente feminina.

A expressão é aguda, inteligente e tranqüila. Os olhos são de tamanho médio, de formato amendoado, inseridos um pouco obliquamente e nunca protrusos. Sua cor é a mais escura

possível. As orelhas são moderadamente pontudas em proporção ao crânio, abertas para a frente e portadas eretas quando em atenção; esse porte ideal é aquele em que o eixo de cada orelha, quando visto de frente, é paralelo ao outro e perpendicular ao chão. Um cão com orelhas amputadas ou caídas deve ser desqualificado.

Vista de frente a testa moderadamente arqueada e o crânio inclina-se em direção ao focinho longo em forma de cunha, sem uma parada abrupta. O focinho é comprido e forte e sua linha superior é paralela à linha superior do crânio. O nariz é preto. Um cão cujo nariz não seja predominantemente preto deverá ser desqualificado. Os lábios são firmemente ajustados. As maxilas são fortemente desenvolvidas. Os dentes em número de 42-20 em cima e 22 em baixo – são muito desenvolvidos e dispostos em uma mordedura em tesoura, na qual a face interna dos incisivos superiores encaixa-se na face externa dos incisivos inferiores. Protrusão do maxilar superior ou mordedura em torquês são indesejáveis. Prognatismo é uma falta desqualificante, a dentição completa deve ser preferida. Qualquer falta dentária que não seja a dos primeiros molares é uma falta séria.

Pescoço, linha superior, corpo

O pescoço é forte e musculoso, bem delineado e relativamente longo em proporção ao tamanho da cabeça e sem pregas de pele solta. Quando o cão está em atenção ou excitado a cabeça fica elevada e o pescoço portado alto e quando em movimento, o porte típico da cabeça é mais para frente do que para cima, mas um pouco mais alta do que a parte superior dos ombros.

Linha superior

A cernelha é o ponto mais alto, e inclina-se em relação ao dorso em nível. A linha superior é reta e de desenvolvimento muito forte, sem ceder ou carpear, e relativamente curta.

Toda a estrutura do corpo dá a impressão de profundidade e solidez sem grosseria. O tórax começa pelo antepeito que é bem cheio e portado bem baixo por entre as pernas. É profundo e de boa capacidade, nunca raso, com amplo espaço para os pulmões e o coração; situado bem para diante com antepeito, de perfil, aparecendo adiante da ponta do ombro. As costelas são bem arqueadas e longas, nem em forma de barril nem achatadas e se prolongam bem para baixo até o esterno, que atinge os cotovelos. O arqueamento correto das costelas permite que os cotovelos se movam livremente para trás quando o cão esta a trote. Se muito arredondadas, interferem nos cotovelos, expulsando-os para fora; se muito achatadas ou curtas provocam cotovelos compridos contra o tórax. As costelas se entendem bem para trás de forma que o lombo é relativamente curto. O abdômen é firmemente sustentado e nunca deve estar distendido. A linha inferior é apenas, moderadamente, esgalgada na altura. O lombo quando visto de cima, é largo e forte, quando visto de lado, comprimento inadequado entre a última costela e a coxa é indesejável. A garupa é comprida e inclina-se gradualmente.

A cauda é do tipo da de raposa, com a última vértebra estendendo-se, ao menos, até a junta do jarrete. É inserida harmonicamente, na garupa, mais para baixa do que para alta. Em

repouso a cauda fica pendurada com uma ligeira curva como um sabre. Um leve gancho – às vezes levado para um dos lados – é faltoso, apenas, até o ponto em que possa prejudicar a aparência geral. Quando o cão está excitado ou em movimento, a curva se acentua e a cauda é elevada, mas nunca poderá se curvar para frente além da linha vertical. Caudas muito curtas, ou com terminação grossa, devida à anquilose, são faltas sérias. Um cão com cauda amputada de ser desqualificada.

Membros anteriores

As escápulas são compridas e anguladas obliquamente, colocadas de forma plana e não deslocadas para a frente. O braço junta-se com a escápula em um ângulo, relativamente, reto. Os ombros e os braços são bem musculosos. As pernas da frente, vistas por qualquer ângulo são retas e a ossatura é mais para oval do que para redonda. Os metacarpos são fortes e elásticos, angulados em relação à vertical, em 25 graus, aproximadamente. Quintos dedos nos anteriores podem ser removidos, mas são, normalmente, deixados.

Os pés são curtos, compactos com dedos bem arqueados, almofadas grossas e firmes, unhas curtas e escuras.

Membros posteriores

Todo o conjunto posterior visto de lado é largo, com as coxas e as pernas de trás, bem musculosas, formando um ângulo, relativamente reto. O fêmur é paralelo à escápula enquanto que a tíbia-fíbula paralela ao úmero. O metatarso é curto, forte e firmemente articulado. Os quintos dedos das pernas de trás, se houver algum, devem ser removidos.

Pelagem

A cor ideal tem uma pelagem dupla de comprimento médio. O pelo extremo deve ser mais denso possível, com pelos retos, ásperos e assentados junto ao corpo. É permitida uma ligeira ondulação do pelo externo, o qual muitas vezes é de textura dura. A cabeça (incluindo a parte externa das orelhas e o focinho), as pernas e os pés são cobertos por pelos curtos; o pescoço com pelos mais longos e espessos. O pelo na parte de trás das pernas anteriores e posteriores é tanto quanto longo e se estende, respectivamente, até o corpo e o jarrete. Pelo macio, sedoso, muito comprido, lanoso, encaracolado ou aberto consistem faltas da pelagem.

Cor

O pastor alemão varia de cor e muitas são as cores permitidas. As preferidas são as cores ricas e fortes. Cores pálidas, lavadas e azuis ou fígado são faltas sérias. Um cão branco deve ser desqualificado.

Movimentação

O pastor alemão é um cão trotador e sua estrutura foi desenvolvida para satisfazer os requisitos de seu trabalho. Sua movimentação é de grande alcance, elástica, aparentando ser feita sem esforços, suave e rítmica, e cobrindo um máximo de solo com um mínimo de passadas.

A passo, ele cobre um grande espaço no chão, com muito dos anteriores e posteriores. A trote o cão cobre ainda muito mais com um alcance mais longo e se move poderosamente, mas de uma maneira fácil, com coordenação e de maneira balanceada de modo que a locomoção parece constante como a de uma máquina bem lubrificada. Os pés trabalham junto ao solo, tanto no alcance anterior, como na impulsão do posterior. A fim de obter essa movimentação ideal ele precisa ter bom desenvolvimento muscular e bons ligamentos. Os posteriores liberam através da linha superior um poderoso impulso para frente que eleva, ligeiramente, todo o animal e dirige o corpo para diante. O pé de trás, toma apoio no chão alcançando bem embaixo e ultrapassando a marca deixada pelo pé da frente. Depois o jarrete, joelho e coxa entram em ação e empurram para trás, a propulsão da perna de Trás termina com o pé ainda rente ao chão levado para trás de maneira suave, pela ação da gravidade. O sobre-alcance do posterior, geralmente, requer que um pé de trás passe por fora e o outro pé de trás, passe por dentro, do trabalho dos pés da frente, e esta ação não é Feitosa, a menos que provoque ação de caranguejar, com o corpo do cão entortando para um dos lados, fora da linha reta normal.

O seu típico trote flutuante, suave, é mantido com grande força e firmeza da linha superior. Todo esforço do posterior é transmitido para o anterior através do lombo, dorso e ombros. Em trote total, a linha superior deve permanecer firme e em nível sem selar, oscilar para os lados ou para cima, ou arquear. A linha superior em desnível, ficando a cernelha mais baixa do que a ponta da garupa é uma falta.

Para compensar o deslocamento para frente produzida pelo posterior o ombro deve abrir-se na sua mais ampla extensão. As pernas da frente devem ter grande cobertura de solo, com passadas longas em harmonia com a dos posteriores. Quando trotando, a fim de manter o balanceamento, os pés não devem trabalhar em linhas paralelas muito separadas, são levados para dentro, em direção à linha mediana do corpo. Os pés trabalham perto, mas não se chegam ou cruzam. Vistas de frente as pernas anteriores – da – junta do ombro até o pé trabalham dentro de uma linha reta. Vistos por trás, os posteriores – da articulação femoro-coxal até o pé – trabalham dentro de uma linha reta. Falta de movimentação vista quer de frente, de trás ou de lado, devem ser consideradas faltas muito sérias.

Temperamento

A raça tem personalidade, distintamente, marcada por uma expressão sincera e destinada; nunca hostil, mas alto confiante e com certa indiferença. Não é propenso a fazer amizades imediata, ou indiscriminadamente.

O cão deve permitir aproximações ficando tranqüilo em seu território e mostrar confiança para primeiras apresentações, sem que ele mesmo as provoque. Ele é equilibrado, porém quando a ocasião requer, impetuoso e alerta; tanto capaz, como disposto, por suas aptidões para trabalhar como companhia, cão de alarme, guia de cego, pastor, ou guardião, de acordo com o que as circunstâncias possa requerer. Não deve ser tímido, esconder-se atrás do seu dono ou condutor;

nem deve ser nervoso, e ficar olhando para os lados ou para cima com uma expressão ansiosa ou demonstrando reações nervosas como colocação da cauda por entre as pernas, diante de sons ou sinais estranhos. Falta de confiança, em qualquer ambiente, não é típica de um bom caráter. Qualquer uma das deficiências de caráter acima descritas, que indiquem timidez, deve ser penalizada como falta muito séria; e qualquer cão que apresente indícios pronunciados delas, deve ser recusado nas pistas de exposição. Deve ser possível ao árbitro examinar os dentes e verificar se ambos os testículos estas descidos. Qualquer cão que tente morder o árbitro deve ser desqualificado. O cão ideal é um animal de trabalho com um caráter incorruptível, combinado com corpo e movimentação adequados para um trabalho árduo, que constrói seu propósito primordial.

Desqualificações

- Orelhas cortadas ou caídas.
- Cães com nariz não predominante preto.
- Prognatismo.
- Caudas amputadas.
- Cães brancos.
- Qualquer cão que tente morder o árbitro

Questionário sobre aspectos clínicos

1. Nome do animal
2. Data da coleta
3. Data de nascimento do animal
4. Sexo do animal
5. Houve algum antecedente mórbido?
6. Qual o tipo de alimento que o animal recebe? Houve alguma mudança no tipo de alimentação ao longo da vida do animal?
7. Escore corporal

Critério para classificação de rações para cães**Nível básico**

Classificação dos Alimentos Completos Industrializados para Cães por Família de Produto		
	Descrição dos itens	Status
1.1	Análise química comprobatória dos teores de ácido graxos Omega-3 e Omega-6, individualizados se mencionados nos rótulos	Maior
1.2	Comprovação científica, mediante a apresentação de trabalhos ou experimentação própria, dos nutrientes adicionados com alegação funcional, se citados nos rótulos	Maior
1.3	Existência de análises microbiológicas	Maior
1.4	Existência de “Boas Práticas Fabricação” (BFP) implementadas	Maior

Nível padrão

Classificação dos Alimentos Completos Industrializados para Cães por Família de Produto		
	Descrição dos itens	Status
1.1	Análise química comprobatória dos teores de ácido linoleico	Maior
1.2	Análise química comprobatória dos teores de ácido graxos Omega-3 e Omega-6, individualizados se mencionados nos rótulos	Maior
1.3	Comprovação científica, mediante a apresentação de trabalhos ou experimentação própria, dos nutrientes adicionados com alegação funcional, se citados nos rótulos	Maior
1.4	Existência de análises microbiológicas	Maior
1.5	Existência de “Boas Práticas Fabricação” (BFP) implementadas	Maior

Nível prêmio

Classificação dos Alimentos Completos Industrializados para Cães por Família de Produto

	Descrição dos itens	Status
1.1	Digestibilidade em matéria seca em valor maior ou igual a 75%	Maior
1.2	Digestibilidade em proteína bruta em valor maior ou igual a 75%	Maior
1.3	Digestibilidade extrato etéreo por hidrólise ácida valor maior ou igual a 85%	Maior
1.4	Digestibilidade de extrativos não nitrogenados valor maior ou igual a 80%	Maior
1.5	Existência de valores de energia metabolizável obtidos <i>in vivo</i>	Maior
1.6	Existência de análises comprobatórias dos teores de vitaminas lipossolúveis no alimento(A, D e E)	Maior
1.7	Análise química comprobatória dos teores de ácido linoléico	Maior
1.8	Análise química comprobatória dos teores de ácido graxos Omega-3 e Omega-6, individualizados se mencionados nos rótulos	Maior
1.9	Comprovação científica, mediante a apresentação de trabalhos ou experimentação própria, dos nutrientes adicionados com alegação funcional, se citados nos rótulos	Maior
1.10	Existência de análises microbiológicas	Maior
1.11	Existência de “Boas Práticas Fabricação” (BFP) implementadas	Maior

Nível super prêmio

Classificação dos Alimentos Completos Industrializados para Cães por Família de Produto

	Descrição dos itens	Status
1.1	Digestibilidade em matéria seca em valor maior ou igual a 80%	Maior
1.2	Digestibilidade em proteína bruta em valor maior ou igual a 80%	Maior
1.3	Digestibilidade de extrato etéreo por hidrólise ácida em valor maior ou igual a 90%	Maior
1.4	Digestibilidade de extrativos não nitrogenados em valor maior ou igual a 85%	Maior
1.5	Existência de valores de energia metabolizável obtidos <i>in vivo</i>	Maior
1.6	Existência de análises comprobatórias dos teores de vitaminas lipossolúveis no alimento (A, D e E)	Maior
1.7	Existência de análises comprobatórias dos teores de vitaminas hidrossolúveis no alimento(complexoB)	Maior
1.8	Análise química comprobatória dos teores de ácido linoléico	Maior
1.9	Análise química comprobatória dos teores de ácido graxos Omega-3 e Omega-6, individualizados se mencionados nos rótulos	Maior
1.10	Comprovação científica, mediante a apresentação de trabalhos ou experimentação própria, dos nutrientes adicionados com alegação funcional, se citados nos rótulos	Maior
1.11	Existência de formulação fixa, sem eventuais substitutos	Maior
1.12	Existência de análise de aflatoxina B1 com valor máximo de 10ppb	Maior
1.13	Existência de análise de fumonisina (B1 + B2) com valor máximo de 5000 ppb	Maior
1.14	Existência de análises microbiológicas	Maior
1.15	Existência de Boas Práticas Fabricação (BFP) implementadas	Maior
1.16	Existência de “Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle” (APPCC)	Maior

Termo de ciência

Eu,,
R.G.:, proprietário do animal:,
raça:, declaro para devidos que é de livre espontânea vontade que
submeto meu cão à coleta de sangue feita pela médica veterinária Marcela Custódio,
CRMV-SP 19.999, para que a amostra obtida possa ser utilizada no projeto de pesquisa
intitulado “Frequências dos Polimorfismos *CYP1A2* C1117T e *GSTA3* I71L, Relacionados
ao Metabolismo de Medicamentos e Carcinógenos, Em Cães de Raça e Sem Raça
Definida”.

Campinas, de de 2007.

Proprietário do animal

Marcela Custódio

CRMV-SP: 19.999

Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa (Protocolo:1120-1)

UNICAMP

Universidade Estadual de Campinas
Instituto de Biologia



CEEA-IB-UNICAMP

Comissão de Ética na Experimentação Animal
CEEA-IB-UNICAMP

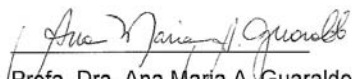
CERTIFICADO

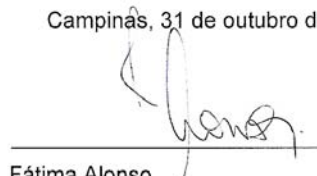
Certificamos que o Protocolo nº 1120-1, sobre "**CARACTERIZAÇÃO DOS GENÓTIPOS DO POLIMORFISMO C1117T DO GENE CYP1A2 RELACIONADO AO METABOLISMO DE CARCINÓGENOS, EM CÃES DE RAÇAS COM ALTÍ INCIDÊNCIA DE CÂNCER**", sob a responsabilidade de **Profa. Dra. Carmem Sílvia Passos Lima / Marcela Custódio**, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal (CEEA)-IB-UNICAMP em 31 de outubro de 2006.

CERTIFICATE

We certify that the protocol nº 1120-1, entitled " _____ ", is in agreement with the Ethical Principles for Animal Research established by the Brazilian College for Animal Experimentation (COBEA). This project was approved by the institutional Committee for Ethics in Animal Research (State University of Campinas - UNICAMP) on October 31, 2006.

Campinas, 31 de outubro de 2006.


Profa. Dra. Ana Maria A. Guaraldo
Presidente


Fátima Alonso
Secretária Executiva

CEEA/IB – Unicamp
Caixa Postal 6109
13083-970 Campinas, SP – Brasil

Telefone: (19) 3788-6359
Telefax: (19) 3788-6356
E-mail: ceea@cemib.unicamp.br
<http://www.ib.unicamp.br/institucional/ceea/index.htm>

Distribuições individualizadas dos 398 cães incluídos no estudo de acordo com características clínicas e genótipos dos polimorfismos CYP1A2 C1117T e GSTA3 I71L

Nº	Iniciais	Idade (Anos)	Sexo	Raça	Dieta	EC	CYP1A2 C1117T	GSTA3 I71L
1	BOX01	4	M	Boxer	Ração Super Prêmio	2	CC	CC
2	BOX02	2,5	F	Boxer	Ração Super Prêmio	2	CC	CC
3	BOX03	12	F	Boxer	Ração Super Prêmio	3	CC	CC
4	BOX04	8	F	Boxer	Ração Super Prêmio	3	CC	CC
5	BOX05	7	F	Boxer	Ração Super Prêmio	2	CC	CC
6	BOX06	1	F	Boxer	Ração Super Prêmio	1	CC	CC
7	BOX07	5,5	M	Boxer	Ração Super Prêmio	2	CC	CC
8	BOX08	10	F	Boxer	Ração Super Prêmio	3	CC	CC
9	BOX09	13	F	Boxer	Ração Super Prêmio	1	CC	CC
10	BOX10	2	M	Boxer	Ração Super Prêmio	2	CC	CC
11	BOX11	1	F	Boxer	Ração Super Prêmio	2	CC	CC
12	BOX12	1	F	Boxer	Ração Super Prêmio	2	CC	CC
13	BOX13	11	F	Boxer	Ração Super Prêmio	2	CC	CC
14	BOX14	11	M	Boxer	Ração Super Prêmio	2	CC	CC
15	BOX15	2	M	Boxer	Ração Super Prêmio	2	CC	CC
16	BOX16	5	F	Boxer	Ração Super Prêmio	2	CC	CC
17	BOX17	5	M	Boxer	Ração Super Prêmio	2	CC	CC
18	BOX18	9	M	Boxer	Ração Super Prêmio	3	CC	CC
19	BOX19	4	M	Boxer	Ração Super Prêmio	2	CC	CC
20	BOX20	0,5	M	Boxer	Ração Super Prêmio	2	CC	CC
21	BOX21	8	M	Boxer	Ração Super Prêmio	2	CC	CC
22	BOX22	4,6	F	Boxer	Ração Super Prêmio	2	CC	CC
23	BOX23	0,5	F	Boxer	Ração Super Prêmio	2	CC	CC
24	BOX24	3	F	Boxer	Ração Super Prêmio	2	CC	CC
25	BOX25	10	M	Boxer	Ração Super Prêmio	2	CC	CC
26	BOX26	12	F	Boxer	Caseira+Ração Prêmio	3	CC	CC
27	BOX27	7	M	Boxer	Ração Padrão	2	CC	CC

Continuação

28	BOX28	1,6	M	Boxer	Ração Super Prêmio	2	CC	CC
29	BOX29	2	F	Boxer	Ração Padrão	2	CC	CC
30	BOX30	0,8	M	Boxer	Ração Padrão	2	CC	CC
31	BOX31	3,8	M	Boxer	Ração Super Prêmio	2	CT	CC
32	BOX32	2,8	M	Boxer	Ração Prêmio	2	CC	CC
33	BOX33	4,5	M	Boxer	Ração Super Prêmio	2	CC	CC
34	BOX34	3,8	F	Boxer	Ração Super Prêmio	2	CC	CC
35	BOX35	3	M	Boxer	Ração Prêmio	2	CC	CC
36	BOX36	10	M'	Boxer	Ração Prêmio	2	CC	CC
37	BOX37	7,5	M	Boxer	Ração Prêmio	2	CC	CC
38	BOX38	1,5	M	Boxer	Ração Prêmio	2	CC	CC
39	BOX39	10	F	Boxer	Ração Prêmio	2	CC	CC
40	BOX40	0,6	M	Boxer	Ração Super Prêmio	2	CC	CC
41	BOX41	0,6	M	Boxer	Ração Super Prêmio	2	CC	CC
42	BOX42	0,5	F	Boxer	Ração Super Prêmio	2	CC	CC
43	BOX43	0,5	F	Boxer	Ração Super Prêmio	2	CC	CC
44	BOX44	2,5	F	Boxer	Ração Prêmio	3	CC	CC
45	BOX45	1,5	F	Boxer	Ração Prêmio	2	CC	CC
46	BOX46	4	F	Boxer	Ração Prêmio	2	CC	CC
47	BOX47	1,5	F	Boxer	Ração Prêmio	2	CC	CC
48	BOX48	2,5	F	Boxer	Ração Prêmio	2	CC	CC
49	BOX49	2,5	F	Boxer	Ração Prêmio	2	CC	CC
50	BOX50	4	F	Boxer	Ração Prêmio	2	CC	CC
51	BOX51	2,5	F	Boxer	Ração Prêmio	2	CC	CC
52	BOX52	6	F	Boxer	Ração Prêmio	3	CC	CC
53	BOX53	4,5	M	Boxer	Ração Prêmio	3	CC	CC
54	BOX54	4,5	F	Boxer	Ração Prêmio	3	CC	CC
55	BOX55	5	F	Boxer	Ração Prêmio	3	CC	CC
56	BOX56	1	F	Boxer	Ração Super Prêmio	2	CC	CC
57	BOX57	1	F	Boxer	Ração Prêmio	2	CC	CC
58	BOX58	1	F	Boxer	Ração Prêmio	2	CC	CC
59	BOX59	1	F	Boxer	Ração Prêmio	2	CC	CC
60	BOX60	3	F	Boxer	Ração Prêmio	2	CC	CC

Continuação

61	BOX61	12	F	Boxer	Ração Super Prêmio	2	CC	CC
62	BOX62	6	F	Boxer	Ração Super Prêmio	3	CC	CC
63	BOX63	5	F	Boxer	Ração Prêmio	3	CC	CC
64	BOX64	5	F	Boxer	Ração Super Prêmio	2	CC	CC
65	BOX65	3	F	Boxer	Ração Super Prêmio	1	CC	CC
66	BOX66	3,5	F	Boxer	Ração Super Prêmio	1	CC	CC
67	BOX67	4	F	Boxer	Ração Super Prêmio	3	CC	CC
68	BOX68	3,5	F	Boxer	Ração Super Prêmio	2	CC	CC
69	BOX69	1,5	F	Boxer	Ração Super Prêmio	2	CC	CC
70	BOX70	0,5	F	Boxer	Ração Super Prêmio	2	CC	CC
71	BOX71	5	F	Boxer	Ração Prêmio	2	CC	CC
72	BOX72	6	F	Boxer	Ração Prêmio	2	CC	CC
73	BOX73	2,5	M	Boxer	Ração Prêmio	2	CC	CC
74	BOX74	0,5	M	Boxer	Ração Prêmio	2	CC	CC
75	BOX75	0,5	M	Boxer	Ração Prêmio	2	CT	CC
76	BOX76	2,5	F	Boxer	Ração Prêmio	2	CC	CC
77	BOX77	1,5	M	Boxer	Ração Prêmio	2	CC	CC
78	BOX78	1,5	M	Boxer	Ração Prêmio	2	CC	CC
79	BOX79	12	F	Boxer	Ração Super Prêmio	3	CC	CC
80	BOX80	6	M	Boxer	Ração Padrão	2	CC	CC
81	BOX81	0,5	F	Boxer	Ração Super Prêmio	3	CC	CC
82	BOX82	12	M	Boxer	Royal Canin Special	1	CC	CC
83	BOX83	0,5	M	Boxer	Ração Super Prêmio	2	CC	CC
84	BOX84	0,5	F	Boxer	Ração Super Prêmio	2	CC	CC
85	BOX85	3	F	Boxer	Royal Canin Special	2	CC	CC
86	BOX86	1	F	Boxer	Ração Super Prêmio	2	CC	CC
87	BOX87	0,5	F	Boxer	Ração Super Prêmio	2	CC	CC
88	BOX88	0,5	F	Boxer	Ração Super Prêmio	2	CC	CC
89	BOX89	4	F	Boxer	Ração Prêmio	1	CC	CC
90	BOX90	0,5	F	Boxer	Ração Super Prêmio	2	CC	CC
91	BOX91	3	F	Boxer	Ração Prêmio	2	CC	CC
92	BOX92	6	F	Boxer	Ração Prêmio	2	CC	CC
93	BOX93	3	M	Boxer	Ração Prêmio	2	CC	CC

Continuação

94	BOX94	0,5	M	Boxer	Ração Super Prêmio	2	CC	CC
95	BOX95	2	M	Boxer	Ração Prêmio	2	CC	CC
96	BOX96	6	F	Boxer	Ração Prêmio	2	CC	CC
97	BOX97	0,5	M	Boxer	Ração Super Prêmio	2	CC	CC
98	BOX98	4	F	Boxer	Ração Prêmio	2	CC	CC
99	BOX99	2	F	Boxer	Ração Prêmio	2	CC	CC
100	BOX100	0,5	F	Boxer	Ração Super Prêmio	2	CC	CC
101	BOX101	4	M	Boxer	Ração Prêmio	3	CC	CC
102	BOX102	7	F	Boxer	Ração Padrão	2	CC	CC
103	BOX103	3	M	Boxer	Ração Padrão	1	CC	CC
104	BOX104	3	M	Boxer	Ração Padrão	2	CC	CC
105	BOX105	3	M	Boxer	Ração Prêmio	2	CC	CC
106	ROTT01	3	M	Rottweiler	Ração Super Prêmio	2	CC	CC
107	ROTT02	4	M	Rottweiler	Ração Super Prêmio	2	CC	CC
108	ROTT03	0,6	M	Rottweiler	Ração Super Prêmio	2	CC	CC
109	ROTT04	0,7	F	Rottweiler	Ração Super Prêmio	2	CC	CC
110	ROTT05	0,8	F	Rottweiler	Ração Super Prêmio	2	CC	CC
111	ROTT06	0,6	F	Rottweiler	Ração Super Prêmio	2	CC	CC
112	ROTT07	3	F	Rottweiler	Ração Super Prêmio	2	CC	CC
113	ROTT08	0,75	F	Rottweiler	Ração Super Prêmio	2	CC	CC
114	ROTT09	1,6	M	Rottweiler	Ração Super Prêmio	2	CC	CC
115	ROTT10	0,8	M	Rottweiler	Ração Super Prêmio	2	CC	CC
116	ROTT11	1,5	F	Rottweiler	Ração Super Prêmio	2	CC	CC
117	ROTT12	5,5	F	Rottweiler	Ração Super Prêmio	2	CC	CC
118	ROTT13	1,8	F	Rottweiler	Ração Super Prêmio	2	CC	CC
119	ROTT14	3	F	Rottweiler	Ração Super Prêmio	2	CC	CC
120	ROTT15	0,8	F	Rottweiler	Ração Super Prêmio	2	CC	CC
121	ROTT16	3	F	Rottweiler	Ração Super Prêmio	2	CC	CC
122	ROTT17	1,5	F	Rottweiler	Ração Super Prêmio	2	CT	CC
123	ROTT18	2,5	F	Rottweiler	Ração Super Prêmio	2	CC	CC
124	ROTT19	0,7	F	Rottweiler	Ração Super Prêmio	2	CC	CC
125	ROTT20	3	F	Rottweiler	Ração Super Prêmio	2	CC	CC
126	ROTT21	1	M	Rottweiler	Ração Super Prêmio	2	CT	CC

Continuação

127	ROTT22	0,6	M	Rottweiler	Ração Super Prêmio	1	CC	CC
128	ROTT23	0,7	M	Rottweiler	Ração Super Prêmio	2	CC	CC
129	ROTT24	2,5	F	Rottweiler	Ração Super Prêmio	2	CC	CC
130	ROTT25	1	M	Rottweiler	Ração Super Prêmio	2	CC	CC
131	ROTT26	1	M	Rottweiler	Ração Super Prêmio	2	CC	CC
132	ROTT27	1	F	Rottweiler	Ração Super Prêmio	2	CC	CC
133	ROTT28	3,5	F	Rottweiler	Ração Super Prêmio	2	CC	CC
134	ROTT29	6,5	M	Rottweiler	Ração Super Prêmio	2	CC	CC
135	ROTT30	4,8	M	Rottweiler	Ração Super Prêmio	2	CC	CC
136	ROTT31	4	F	Rottweiler	Ração Super Prêmio	2	CC	CC
137	ROTT32	5	M	Rottweiler	Ração Super Prêmio	2	CC	CC
138	ROTT33	1	M	Rottweiler	Ração Super Prêmio	2	CC	CC
139	ROTT34	4	M	Rottweiler	Ração Super Prêmio	2	CC	CC
140	ROTT35	1	F	Rottweiler	Ração Super Prêmio	2	CC	CC
141	ROTT36	4	M	Rottweiler	Ração Super Prêmio	2	CC	CC
142	ROTT37	1	M	Rottweiler	Ração Super Prêmio	2	CT	CC
143	ROTT38	3	M	Rottweiler	Ração Super Prêmio	2	CC	CC
144	ROTT39	2	M	Rottweiler	Ração Prêmio	2	CC	CC
145	ROTT40	5,5	M	Rottweiler	Ração Prêmio	2	CC	CC
146	ROTT41	3,6	F	Rottweiler	Ração Prêmio	2	CC	CC
147	ROTT42	0,5	M	Rottweiler	Ração Padrão	2	CT	CC
148	ROTT43	4	M	Rottweiler	Ração Padrão	2	CC	CC
149	ROTT44	12	F	Rottweiler	Ração Padrão	3	CC	CC
150	ROTT45	3	F	Rottweiler	Ração Padrão	3	CC	CC
151	ROTT46	2,8	F	Rottweiler	Ração Super Prêmio	2	CC	CC
152	ROTT47	4	F	Rottweiler	Ração Super Prêmio	3	CT	CC
153	ROTT48	7	M	Rottweiler	Ração Super Prêmio	2	CC	CC
154	ROTT49	9	M	Rottweiler	Ração Prêmio	3	CC	CC
155	ROTT50	6	M	Rottweiler	Ração Prêmio	3	CC	CC
156	ROTT51	7	F	Rottweiler	Ração Super Prêmio	3	CC	CC
157	ROTT52	8	M	Rottweiler	Ração Super Prêmio	3	CC	CC
158	ROTT53	2	F	Rottweiler	Ração Super Prêmio	2	CC	CC
159	ROTT54	6	M	Rottweiler	Ração Super Prêmio	2	CC	CC

Continuação

160	ROTT55	10	F	Rottweiler	Ração Super Prêmio	3	CC	CC
161	ROTT56	6	F	Rottweiler	Ração Super Prêmio	2	CC	CC
162	ROTT57	9	M	Rottweiler	Ração Super Prêmio	3	CC	CC
162	ROTT57	9	M	Rottweiler	Ração Super Prêmio	3	CC	CC
163	ROTT58	10	F	Rottweiler	Ração Padrão	3	CC	CC
164	ROTT59	4	M	Rottweiler	Ração Padrão	2	CC	CC
165	ROTT60	4	M	Rottweiler	Ração Padrão	2	CC	CC
166	ROTT61	12	M	Rottweiler	Ração Super Prêmio	1	CC	CC
167	ROTT62	9	F	Rottweiler	Ração Padrão	3	CC	CC
168	ROTT63	9,8	F	Rottweiler	Ração Padrão	3	CC	CC
169	ROTT64	3	F	Rottweiler	Ração Padrão	3	CC	CC
170	ROTT65	4	M	Rottweiler	Ração Super Prêmio	3	CC	CC
171	ROTT66	1	F	Rottweiler	Ração Prêmio	2	CC	CC
172	ROTT67	2	F	Rottweiler	Ração Super Prêmio	3	CC	CC
173	ROTT68	7	M	Rottweiler	Ração Super Prêmio	3	CC	CC
174	ROTT69	9	M	Rottweiler	Ração Super Prêmio	3	CC	CC
175	ROTT70	3	F	Rottweiler	Ração Super Prêmio	3	CC	CC
176	ROTT71	5	F	Rottweiler	Ração Super Prêmio	3	CC	CC
177	ROTT72	3	M	Rottweiler	Ração Super Prêmio	3	CC	CC
178	ROTT73	3	M	Rottweiler	Ração Super Prêmio	3	CC	CC
179	ROTT74	1,7	F	Rottweiler	Ração Super Prêmio	3	CC	CC
180	ROTT75	0,7	F	Rottweiler	Ração Super Prêmio	3	CC	CC
181	ROTT76	7,5	F	Rottweiler	Ração Super Prêmio	3	CC	CC
182	ROTT77	1	F	Rottweiler	Ração Padrão	3	CC	CC
183	ROTT78	7	F	Rottweiler	Ração Prêmio	3	CC	CC
184	ROTT79	7	F	Rottweiler	Ração Prêmio	3	CC	CC
185	ROTT80	3,5	F	Rottweiler	Ração Padrão	2	CC	CC
186	ROTT81	1,5	F	Rottweiler	Ração Padrão	2	CC	CC
187	ROTT82	1,5	F	Rottweiler	Ração Padrão	2	CC	CC
188	ROTT83	7,6	M	Rottweiler	Ração Padrão	2	CC	CC
189	ROTT84	0,5	F	Rottweiler	Ração Prêmio	2	CC	CC
190	PA01	8	M	PA	Ração Super Prêmio	2	CC	CC
191	PA02	2	M	PA	Ração Super Prêmio	2	CC	CC

Continuação

192	PA03	5	M	PA	Ração Super Prêmio	2	CC	CC
193	PA04	3,5	M	PA	Ração Super Prêmio	2	CC	CC
194	PA05	6	M	PA	Ração Super Prêmio	2	CC	CC
195	PA06	7	M	PA	Ração Super Prêmio	2	CC	CC
196	PA07	2	M	PA	Ração Super Prêmio	2	CC	CC
197	PA08	5	M	PA	Ração Super Prêmio	2	CC	CC
198	PA09	5	M	PA	Ração Super Prêmio	2	CC	CC
199	PA10	4	M	PA	Ração Super Prêmio	2	CC	CC
200	PA11	5	F	PA	Ração Super Prêmio	2	CC	CC
201	PA12	6	M	PA	Ração Super Prêmio	2	CC	CC
202	PA13	2	F	PA	Ração Super Prêmio	2	CC	CC
203	PA14	0,5	F	PA	Ração Super Prêmio	2	CC	CC
204	PA15	3	F	PA	Ração Super Prêmio	2	CC	CC
205	PA16	5	F	PA	Ração Super Prêmio	2	CC	CC
206	PA17	5	M	PA	Ração Super Prêmio	2	CC	CC
207	PA18	5	F	PA	Ração Super Prêmio	2	CC	CC
208	PA19	3	M	PA	Ração Super Prêmio	2	CC	CC
209	PA20	2,5	M	PA	Ração Super Prêmio	2	CC	CC
210	PA21	2,5	M	PA	Ração Super Prêmio	2	CC	CC
211	PA22	2,5	M	PA	Ração Super Prêmio	2	CC	CC
212	PA23	2,5	F	PA	Ração Super Prêmio	2	CC	CC
213	PA24	2,5	F	PA	Ração Super Prêmio	2	CC	CC
214	PA25	2,5	M	PA	Ração Super Prêmio	2	CC	CC
215	PA26	2,5	M	PA	Ração Super Prêmio	2	CC	CC
216	PA27	2,5	M	PA	Ração Super Prêmio	2	CC	CC
217	PA28	2,5	M	PA	Ração Super Prêmio	2	CC	CC
218	PA29	2,5	M	PA	Ração Super Prêmio	2	CC	CC
219	PA30	2,5	M	PA	Ração Super Prêmio	2	CC	CC
220	PA31	2,5	F	PA	Ração Super Prêmio	2	CC	CC
221	PA32	2,5	M	PA	Ração Super Prêmio	2	CC	CC
222	PA33	2,5	M	PA	Ração Super Prêmio	2	CC	CC
223	PA34	2,5	M	PA	Ração Super Prêmio	2	CC	CC
224	PA35	2,5	M	PA	Ração Super Prêmio	2	CC	CC

Continuação

225	PA36	2,5	M	PA	Ração Super Prêmio	2	CC	CC
226	PA37	2,5	F	PA	Ração Super Prêmio	2	CC	CC
227	PA38	2,5	F	PA	Ração Super Prêmio	2	CC	CC
228	PA39	2,5	M	PA	Ração Super Prêmio	2	CC	CC
229	PA40	2,5	M	PA	Ração Super Prêmio	2	CC	CC
230	PA41	2,5	F	PA	Ração Super Prêmio	2	CC	CC
231	PA42	2,5	F	PA	Ração Super Prêmio	2	CC	CC
232	PA43	2,5	F	PA	Ração Super Prêmio	2	CC	CC
233	PA44	4	M	PA	Ração Super Prêmio	3	CC	CC
234	PA45	3	M	PA	Ração Super Prêmio	3	CC	CC
235	PA46	5	M	PA	Ração Super Prêmio	2	CC	CC
236	PA47	2	M	PA	Ração Super Prêmio	2	CC	CC
237	PA48	1	M	PA	Ração Prêmio	2	CC	CC
238	PA49	12	F	PA	Ração Padrão	2	CC	CC
239	PA50	2	F	PA	Ração Super Prêmio	2	CC	CC
240	PA51	15	M	PA	Ração Super Prêmio	1	CC	CC
241	PA52	3	M	PA	Ração Prêmio	2	CC	CC
242	PA53	0,6	M	PA	Ração Super Prêmio	2	CC	CC
243	PA54	4	F	PA	Ração Prêmio	2	CC	CC
244	PA55	0,5	M	PA	Ração Prêmio	2	CC	CC
245	PA56	3	M	PA	Ração Super Prêmio	2	CT	CC
246	PA57	7	M	PA	Ração Super Prêmio	2	CC	CC
247	PA58	6	M	PA	Ração Prêmio	3	CC	CC
248	PA59	8	F	PA	Ração Prêmio	3	CC	CC
249	PA60	2	M	PA	Ração Prêmio	2	CC	CC
250	PA61	5	F	PA	Ração Super Prêmio	2	CC	CC
251	PA62	0,5	M	PA	Ração Super Prêmio	2	CC	CC
252	PA63	1	F	PA	Ração Super Prêmio	2	CC	CC
253	PA64	1	F	PA	Ração Super Prêmio	2	CC	CC
254	PA65	3	M	PA	Ração Super Prêmio	2	CC	CC
255	PA66	4	F	PA	Ração Prêmio	2	CC	CC
256	PA67	2	F	PA	Ração Super Prêmio	2	CC	CC
257	PA68	3	F	PA	Ração Prêmio	2	CC	CC

Continuação

258	PA69	3	M	PA	Ração Padrão	2	CC	CC
259	PA70	6	F	PA	Ração Super Prêmio	2	CC	CC
260	PA71	4	F	PA	Ração Super Prêmio	2	CC	CC
261	PA72	1	F	PA	Ração Super Prêmio	2	CC	CC
262	PA73	4	F	PA	Ração Super Prêmio	2	CC	CC
263	PA74	4	F	PA	Ração Super Prêmio	2	CC	CC
264	PA75	6	M	PA	Ração Prêmio	2	CC	CC
265	PA76	0,6	M	PA	Ração Super Prêmio	2	CC	CC
266	PA77	0,7	M	PA	Ração Super Prêmio	2	CC	CC
267	PA78	0,5	F	PA	Ração Super Prêmio	2	CC	CC
268	PA79	4	F	PA	Ração Prêmio	2	CC	CC
269	PA80	0,7	M	PA	Ração Super Prêmio	2	CC	CC
270	PA81	6	F	PA	Ração Super Prêmio	2	CC	CC
271	PA82	0,5	F	PA	Ração Super Prêmio	2	CC	CC
272	PA83	9	M	PA	Ração Prêmio	2	CC	CC
273	PA84	2	F	PA	Ração Super Prêmio	2	CC	CC
274	PA85	7	M	PA	Ração Prêmio	2	CC	CC
275	PA86	4	F	PA	Ração Super Prêmio	2	CC	CC
276	PA87	3	F	PA	Ração Super Prêmio	2	CC	CC
277	PA88	0,5	M	PA	Ração Super Prêmio	2	CC	CC
278	PA89	4	F	PA	Ração Super Prêmio	2	CC	CC
279	PA90	0,7	M	PA	Ração Super Prêmio	2	CT	CC
280	PA91	3	F	PA	Ração Super Prêmio	2	CC	CC
281	PA92	0,5	M	PA	Ração Super Prêmio	2	CT	CC
282	PA93	4	M	PA	Ração Prêmio	2	CT	CC
283	PA94	3	M	PA	Ração Prêmio	2	CT	CC
284	PA95	1	F	PA	Ração Super Prêmio	2	CC	CC
285	PA96	6,5	M	PA	Ração Super Prêmio	2	CC	CC
286	PA97	1	M	PA	Ração Super Prêmio	2	CC	CC
287	PA98	0,6	M	PA	Ração Super Prêmio	2	CC	CC
288	PA99	0,6	M	PA	Ração Super Prêmio	2	CC	CC
289	PA100	0,5	M	PA	Ração Super Prêmio	2	CC	CC
290	PA101	2	F	PA	Ração Super Prêmio	2	CT	CC

Continuação

291	PA102	8	M	PA	Ração Super Prêmio	1	CT	CC
292	PA103	10	F	PA	Ração Padrão	3	CC	CC
293	PA104	4	F	PA	Ração Prêmio	2	CC	CC
294	PA105	2	M	PA	Ração Super Prêmio	2	CC	CC
295	PA106	3	M	PA	Ração Padrão	2	CC	CC
296	PA107	3,5	M	PA	Ração Padrão	2	CC	CC
297	PA108	9	F	PA	Ração Padrão	2	CC	CC
298	PA109	11,5	M	PA	Ração Padrão	2	CC	CC
299	PA110	2	F	PA	Ração Padrão	2	CC	CC
300	SRD1	3	F	SRD	Ração Básica	2	CC	CC
301	SRD2	2	F	SRD	Ração Básica	2	CT	CC
302	SRD3	1	F	SRD	Ração Básica	1	CC	CC
303	SRD4	3	F	SRD	Ração Básica	3	CC	CC
304	SRD5	4	M	SRD	Ração Básica	2	CC	CC
305	SRD6	3	F	SRD	Ração Básica	2	CC	CC
306	SRD7	2	F	SRD	Ração Básica	2	CC	CC
307	SRD8	3	M	SRD	Ração Básica	2	CC	CC
308	SRD9	2	F	SRD	Ração Básica	2	CC	CC
309	SRD10	8	M	SRD	Ração Básica	3	CC	CC
310	SRD11	3	F	SRD	Ração Básica	3	CC	CC
311	SRD12	4	F	SRD	Ração Básica	3	CC	CC
312	SRD13	6	F	SRD	Ração Básica	2	CC	CC
313	SRD14	6	M	SRD	Ração Básica	2	CC	CC
314	SRD15	4	F	SRD	Ração Básica	2	CC	CC
315	SRD16	3	M	SRD	Ração Básica	2	CC	CC
316	SRD17	3	F	SRD	Ração Básica	3	CT	CC
317	SRD18	1	F	SRD	Ração Básica	3	CC	CC
318	SRD19	2	M	SRD	Ração Básica	1	CC	CC
319	SRD20	6	F	SRD	Ração Básica	1	CC	CC
320	SRD21	6	F	SRD	Ração Básica	2	CC	CC
321	SRD22	1	F	SRD	Ração Básica	2	CT	CC
322	SRD23	11	M	SRD	Ração Básica	1	CC	CC
323	SRD24	4	F	SRD	Ração Básica	3	CC	CC

Continuação

324	SRD25	2	M	SRD	Ração Básica	2	CT	CC
325	SRD26	2	M	SRD	Ração Básica	3	CC	CC
326	SRD27	2	F	SRD	Ração Básica	3	CC	CC
327	SRD28	3	F	SRD	Ração Básica	1	CC	CC
328	SRD29	3	F	SRD	Ração Básica	2	CC	CC
329	SRD30	6	F	SRD	Ração Básica	2	CC	CC
330	SRD31	10	M	SRD	Ração Básica	2	CC	CC
331	SRD32	4	F	SRD	Ração Básica	3	CT	CC
332	SRD33	5	M	SRD	Ração Básica	2	CC	CC
333	SRD34	2	F	SRD	Ração Básica	2	CC	CC
334	SRD35	6	F	SRD	Ração Básica	2	CT	CC
335	SRD36	5	F	SRD	Ração Básica	2	CC	CC
336	SRD37	7	M	SRD	Ração Básica	1	CC	CC
337	SRD38	1	M	SRD	Ração Básica	3	CC	CC
338	SRD39	1	F	SRD	Ração Básica	2	CC	CC
339	SRD40	11	F	SRD	Ração Básica	2	CC	CC
340	SRD41	5	F	SRD	Ração Básica	1	CC	CC
341	SRD42	6	F	SRD	Ração Premium	3	CC	CC
342	SRD43	10	F	SRD	Ração Premium	3	CC	CC
343	SRD44	11	F	SRD	Ração Padrão	2	CC	CC
344	SRD45	1	F	SRD	Ração Padrão	2	CC	CC
345	SRD46	11	F	SRD	Ração Básica	2	CC	CC
346	SRD47	3	F	SRD	Ração Padrão	3	CC	CC
347	SRD48	3	F	SRD	Ração Padrão	3	CC	CC
348	SRD49	3	M	SRD	Ração Padrão	3	CT	CC
349	SRD50	2	F	SRD	Ração Padrão	2	CC	CC
350	SRD51	4	F	SRD	Ração Padrão	2	CC	CC
351	SRD52	9	F	SRD	Ração Básica	2	CC	CC
352	SRD53	11	F	SRD	Comida Caseira	2	CT	CC
353	SRD54	10	F	SRD	Ração Padrão	2	CC	CC
354	SRD55	2	F	SRD	Ração Premium	2	CC	CC
355	SRD56	4	F	SRD	Ração Premium	2	CC	CC
356	SRD57	14	F	SRD	Ração Premium	2	CC	CC

Continuação

357	SRD58	5	F	SRD	Ração Premium	2	CC	CC
358	SRD59	3	F	SRD	Ração Premium	2	CC	CC
359	SRD60	10	F	SRD	Ração Premium	2	CC	CC
360	SRD61	7	M	SRD	Ração Premium	2	CT	CC
361	SRD62	7	F	SRD	Ração Premium	2	CC	CC
362	SRD63	6	M	SRD	Ração Premium	2	CC	CC
363	SRD64	10	F	SRD	Ração Premium	3	CC	CC
364	SRD65	7	F	SRD	Ração Premium	2	CC	CC
365	SRD66	10	M	SRD	Ração Premium	2	CC	CC
366	SRD67	5	F	SRD	Ração Premium	2	CC	CC
367	SRD68	7	F	SRD	Ração Premium	2	CT	CC
368	SRD69	14	M	SRD	Ração Premium	2	CC	CC
369	SRD70	10	M	SRD	Ração Premium	2	CC	CC
370	SRD71	4	F	SRD	Ração Premium	2	CC	CC
371	SRD72	6	F	SRD	Ração Premium	3	CC	CC
372	SRD73	6	F	SRD	Ração Premium	3	CC	CC
373	SRD74	3	M	SRD	Ração Premium	2	CC	CC
374	SRD75	7	M	SRD	Ração Premium	2	CC	CC
375	SRD76	10	F	SRD	Ração Premium	2	CT	CC
376	SRD77	6	M	SRD	Ração Premium	3	CC	CC
377	SRD78	5	F	SRD	Ração Premium	2	CC	CC
378	SRD79	10	M	SRD	Ração Premium	3	CC	CC
379	SRD80	10	F	SRD	Ração Premium	2	CC	CC
380	SRD81	2	F	SRD	Ração Premium	2	CC	CC
381	SRD82	2	F	SRD	Ração Premium	3	CC	CC
382	SRD83	6	M	SRD	Ração Premium	2	CC	CC
383	SRD84	6	F	SRD	Ração Premium	2	CT	CC
384	SRD85	7	M	SRD	Ração Premium	2	CC	CC
385	SRD86	14	F	SRD	Ração Premium	1	CC	CC
386	SRD87	4	M	SRD	Ração Premium	2	CC	CC
387	SRD88	3	M	SRD	Ração Premium	2	CC	CC
388	SRD89	5	M	SRD	Ração Premium	2	CC	CC
389	SRD90	6	F	SRD	Ração Premium	3	CC	CC

Continuação

390	SRD91	6	M	SRD	Ração Premium	2	CC	CC
391	SRD92	1,5	F	SRD	Ração Padrão	2	CC	CC
392	SRD93	3	F	SRD	Comida Caseira	2	CC	CC
393	SRD94	14	F	SRD	Comida Caseira	2	CC	CC
394	SRD95	6	M	SRD	Comida Caseira	2	CC	CC
395	SRD96	14	M	SRD	Comida Caseira	2	CC	CC
396	SRD97	4	F	SRD	Comida Caseira	2	CC	CC
397	SRD98	12	M	SRD	Comida Caseira	2	CC	CC
398	SRD99	4	F	SRD	Ração Padrão	2	CC	CC

EC: escore corporal, onde 1 é magro, 2 é ideal e 3 é sobrepeso; M: masculino; F: feminino;

PA: pastor alemão; SRD: sem raça definida