República Federativa do Brasil
Ministério da Indústria, Comércio Exterior
e Serviços
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(11) PI 0818293-0 B1

(22) Data do Depósito: 03/10/2008

(45) Data de Concessão: 28/03/2017

(54) Título: USO DE COBRE NA PREPARAÇÃO DE UM GÊNERO ALIMENTÍCIO, USO DO REFERIDO GÊNERO ALIMENTÍCIO COMPREENDENDO COBRE, E MÉTODO PARA DETERMINAR A SUSCETIBILIDADE DE UM CÃO AO ACÚMULO DE COBRE NO FÍGADO

(51) Int.Cl.: C12Q 1/68; A23K 10/00; A23K 30/00

(30) Prioridade Unionista: 03/10/2007 GB 07 19358.4

(73) Titular(es): MARS, INCORPORATED

(72) Inventor(es): PAUL GLYN JONES; ALAN JAMES MARTIN; GABY HOFFMANN; JAN ROTHUIZEN

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para **"USO DE COBRE NA PREPARAÇÃO DE UM GÊNERO ALIMENTÍCIO, USO DO REFERIDO GÊNERO ALIMENTÍCIO COMPREENDENDO COBRE, E MÉTODO PARA DETERMINAR A SUSCETIBILIDADE DE UM CÃO AO ACÚMULO DE COBRE NO FÍGADO".**

Campo da Invenção

A presente invenção refere-se a um método para determinar a suscetibilidade de um cão ao acúmulo de cobre no fígado e a doença hepática associada ao cobre. A invenção também refere-se a gêneros alimentícios para cães para o uso na prevenção do acúmulo de cobre no fígado e doença hepática associada ao cobre e um método para fazer os gêneros alimentícios.

Antecedentes da Invenção

Embora as doenças hepáticas sejam raras nos cães, uma de suas formas mais comuns é a hepatite crônica (CH). A CH é um diagnóstico histológico, caracterizado pela presença de fibrose, inflamação, e apoptose hepatocelular e necrose. A cirrose pode resultar como o estágio final da doença. Uma das causas da CH é o acúmulo de cobre hepático. O acúmulo de cobre hepático pode resultar da ingestão aumentada de cobre, uma falha metabólica primária do metabolismo de cobre hepático, ou a partir da excreção biliar alterada do cobre. Os cães com acúmulo de cobre hepático excessivo são tratados tipicamente com D-penicilamina, um quelante de cobre potente.

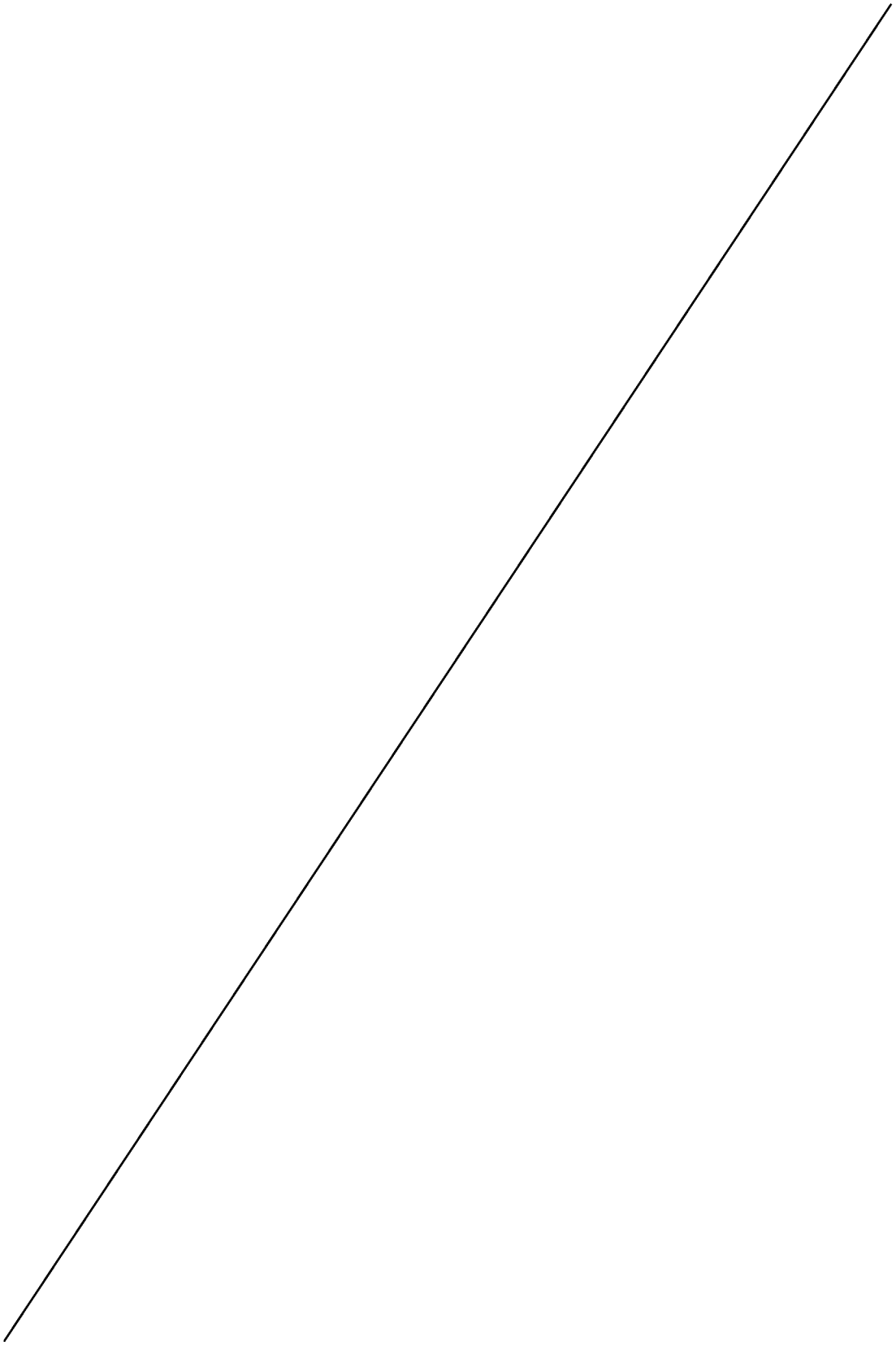
Sumário da Invenção

Os inventores descobriram que polimorfismos em ou na região dos genes GOLGA5, ATP7a e UBL5 caninos são indicativos da suscetibilidade ao acúmulo de cobre no fígado nos cães. A descoberta que os polimorfismos nestas três regiões genômicas estão associados com o risco de acúmulo de cobre no fígado fornece a base para um teste para prever a suscetibilidade de um cão ao acúmulo de cobre no fígado pela seleção por polimorfismos. O poder de previsão do teste pode ser ampliado usando modelos que envolvem combinar os resultados de detectar um ou mais dos polimorfismos definidos.

O acúmulo de cobre no fígado de um cão pode levar a uma ou mais doenças ou condições do fígado que são atribuíveis ao cobre no fígado

Segue-se folha 1a

elevado. Por exemplo, cobre no fígado elevado pode levar à hepatite crônica, à cirrose hepática e no final das contas à falência hepática. A invenção permite assim que os cães sejam identificados como sendo suscetíveis a tais doenças



Segue-se folha 2

ou condições hepáticas que são associadas com o cobre elevado. Uma vez que a suscetibilidade de um cão ao acúmulo de cobre no fígado tenha sido identificada é possível identificar medidas preventivas apropriadas para esse cão, com o propósito de manter o nível de cobre no fígado em um nível baixo ou normal, tal como pela administração dos gêneros alimentícios da invenção.

A invenção fornece um método para determinar a suscetibilidade de um cão ao acúmulo de cobre no fígado que compreende detectar a presença ou a ausência (a) de polimorfismo no gene GOLGA5, ATP7a ou UBL5 do cão que é indicativo da suscetibilidade ao acúmulo de cobre e/ou (b) um polimorfismo em desequilíbrio de ligação com um referido polimorfismo (a), e desse modo de determinar a suscetibilidade do cão ao acúmulo de cobre no fígado.

A invenção também fornece:

- uma base de dados que compreende a informação em relação a um ou mais polimorfismos nos genes GOLGA5, ATP7a ou UBL5 e/ou um ou mais polimorfismos em desequilíbrio de ligação dos mesmos e a sua associação com a suscetibilidade de um cão ao acúmulo de cobre no fígado;

- um método para determinar a suscetibilidade de um cão ao acúmulo de cobre no fígado, o método que compreende:

(a) entrada a um sistema de dados de computador em relação à presença ou à ausência no genoma do cão de um polimorfismo como definido aqui;

(b) comparar os dados a uma base de dados de computador, em que a base de dados compreenda informação em relação a um ou mais polimorfismos nos genes GOLGA5, ATP7a ou UBL5 e/ou um ou mais polimorfismos em desequilíbrio de ligação dos mesmos e sua associação com a suscetibilidade de um cão ao acúmulo de cobre no fígado; e

(c) determinar com base na comparação a suscetibilidade de um cão o acúmulo de cobre no fígado;

- um programa de computador que compreende meios de código de programa que, quando executado em um sistema de computador, instrui

o sistema de computador a realizar um método da invenção;

- um meio de armazenamento de computador que compreende o programa de computador da invenção e a base de dados da invenção;

- um sistema de computador arranjado para realizar um método da invenção que compreende:

(a) meios para receber dados a respeito da presença ou da ausência no genoma do cão de um polimorfismo como definido aqui;

(b) um módulo para comparar os dados com uma base de dados que compreende informação em relação a um ou mais polimorfismos nos genes GOLGA5, ATP7a ou UBL5 e/ou em um ou mais polimorfismos em desequilíbrio de ligação dos mesmos e sua associação com a suscetibilidade de um cão ao acúmulo de cobre no fígado; e

(c) meios para determinar com base na referida comparação da suscetibilidade de um cão ao acúmulo de cobre no fígado;

- um método para determinar se o genoma de um cão contém um polimorfismo que seja indicativo da suscetibilidade do cão ao acúmulo de cobre no fígado, compreendendo detectar a presença ou a ausência (a) de um polimorfismo no gene GOLGA5, ATP7a ou UBL5 do cão que é indicativo da suscetibilidade ao acúmulo de cobre e/ou (b) de um polimorfismo em desequilíbrio de ligação com o referido polimorfismo (a); e

- uso (a) de um polimorfismo no gene GOLGA5, ATP7a ou UBL5 de um cão que é indicativo da suscetibilidade ao acúmulo de cobre no fígado e/ou (b) de um polimorfismo em desequilíbrio de ligação com um referido polimorfismo (a) para determinar a suscetibilidade de um cão ao acúmulo de cobre no fígado.

Além disso, e surpreendentemente, os inventores agora descobriram gêneros alimentícios os quais são mais efetivos na redução da concentração de cobre hepático em Labradores Retriever do que o uso da fármaco penicilamina. Estes gêneros alimentícios são consequentemente úteis na prevenção do acúmulo de cobre no fígado de cães da raça Labrador Retriever e pode ser usada para prevenir uma doença ou uma condição associada com o cobre no fígado elevado tal como a hepatite crônica, cirrose e

falência hepática.

Conformemente, a presente invenção também fornece gêneros alimentícios compreendendo cobre em uma concentração menor que 21 mg/kg de matéria seca para o uso na prevenção de uma doença atribuível ao acúmulo de cobre no fígado em um cão que tem a herança genética da raça Labrador Retriever.

A presente invenção ainda fornece:

- um método para prevenir uma doença atribuível ao acúmulo de cobre no fígado em um cão que tem a herança genética da raça Labrador Retriever, compreendendo alimentar o cão com gêneros alimentícios da invenção;

- um método para fazer os gêneros alimentícios da invenção, compreendendo misturar junto os ingredientes para os gêneros alimentícios de modo que os gêneros alimentícios tenham uma concentração de cobre menor que 21 mg/kg de matéria seca;

- uso do cobre na fabricação de gêneros alimentícios para um cão que tem genético herança da raça Labrador Retriever, onde os gêneros alimentícios compreendem o cobre em uma concentração menor que 21 mg/kg de matéria seca e são para o uso na prevenção de uma doença atribuível ao acúmulo de cobre no fígado no referido cão;

- uma embalagem que compreende um gênero alimentício contendo o cobre em uma concentração menor que 21 mg/kg de matéria seca e um suplemento de zinco para fornecer uma concentração de pelo menos 120 mg/kg de matéria seca para uso simultâneo, separado ou sequencial na prevenção de uma doença atribuível ao acúmulo de cobre no fígado em um cão que tem a herança genética da raça Labrador Retriever; e

- gêneros alimentícios marcados de acordo com a invenção ou embalagem marcada de acordo com a invenção.

Breve Descrição das Figuras

A figura 1 ilustra a progressão do acúmulo de cobre hepático sem tratamento. A figura mostra as concentrações de cobre hepático (mg/kg de peso seco) a partir de 11 Labradores Retriever em dois exames com 8,7

meses (faixa de 6-15 meses) de distância, antes de qualquer tratamento. Durante este tempo todos os animais foram alimentados com sua dieta usual de manutenção, que de acordo com os fabricantes contêm concentrações de cobre dietéticas entre 12-25 mg/kg em uma base de matéria seca e concentrações de zinco entre 80-270 mg/kg em uma base de matéria seca. Os símbolos de diamante representam valores discrepantes.

A figura 2 ilustra concentrações de cobre hepático (mg/kg de matéria seca) de 24 Labradores Retriever no início do estudo e em 2 exames de controle durante a gerência dietética. Os cães foram divididos em dois grupos como segue: grupo 1 = dieta + comprimidos de gluconato de zinco, grupo 2 = dieta + placebo. A chave para a numeração do eixo-x é como segue: 1 + 2 = antes do tratamento, 3 + 4 = verificar novamente 1 (primeiro exame de controle após 8 meses (faixa de 5-13 meses)), 5 + 6 = verificar novamente 2 (segundo exame de controle após 16 meses (faixa de 12-25 meses)). Os números de cães testados são como segue: 1: N = 12 cães no grupo 1, 2: N = 12 cães no grupo 2, 3: N = 9 cães no grupo 1, 4: N = 12 cães no grupo 2, 5: N = 6 cães no grupo 1, 6: N = 10 cães no grupo 2. Os símbolos de diamante representam valores discrepantes. A linha pontilhada representa o nível normal de cobre hepático em cães adultos.

A figura 3 ilustra a eficácia da dieta da invenção em concentrações de cobre hepático (mg/kg de matéria seca) em 18 Labradores Retriever comparados com efeito da penicilamina sozinho. A chave ao eixo-x é como segue: 1 = pré-penicilamina, 2 = pós-penicilamina/pré-alimento, 3 = pós-alimento. A progressão ao longo do eixo-x de 1 para 2 demonstra o efeito da penicilamina, enquanto a progressão de 2 para 3 demonstra o efeito do alimento. A linha pontilhada representa o nível normal de cobre hepático para cães adultos.

A figura 4 ilustra esquematicamente modalidades dos componentes funcionais arranjados para realizar a presente invenção.

Breve Descrição das Sequências

SEQ ID NOs: 1 a 129 mostram as sequências de polinucleotídeo abrangendo os SNPs da invenção.

Descrição Detalhada da Invenção

Identificando a suscetibilidade ao acúmulo de cobre no fígado

O acúmulo de cobre no fígado leva à doença hepática em várias raças de cão, incluindo o Labrador Retriever, Doberman Pinscher, German Shepherd, Keeshond, Cocker Spaniel, West Highle White Terrier, Bedlington Terrier, e Skye Terrier. A concentração de cobre média no fígado de cães normais de qualquer raça é de 200 a 400 mg/kg em uma base de peso seco, embora os recém-nascidos tenham geralmente concentrações de cobre no fígado mais elevadas.

Um cão que seja suscetível ao acúmulo de cobre tem uma tendência acumular cobre de forma que sua concentração de cobre no fígado atinge um nível acima de 400 mg/kg, por exemplo, acima de 500 mg/kg, 600 mg/kg, 800 mg/kg, 1000 mg/kg, 1500 mg/kg, 2000 mg/kg, 5000 mg/kg, ou acima de 10000 mg/kg. Determinando a suscetibilidade de um cão ao acúmulo de cobre no fígado de acordo com a invenção envolve determinar o risco ou a probabilidade que o cão irá acumular o cobre no fígado a um nível acima de 400 mg/kg. Isto pode, por exemplo, ser expresso como um fator de risco, porcentagem ou probabilidade. Pode ser possível determinar se um cão irá acumular o cobre nos níveis descritos acima.

O acúmulo de cobre no fígado a um nível acima de 400 mg/kg é associado com doença hepática e pode finalmente conduzir à falência hepática. Determinar a suscetibilidade de um cão ao acúmulo de cobre no fígado portanto também fornece uma maneira de determinar a suscetibilidade do cão a uma doença ou a uma condição atribuível ao acúmulo de cobre no fígado tal como hepatite crônica, cirrose e falência hepática.

Método para elucidar polimorfismos ligados a um traço genético

Os inventores desenvolveram um método para determinar os polimorfismos associados com um traço genético em um grupo de indivíduos, a saber "Mapeamento de Partição" (também conhecido como "mapeamento 2D"). O método é limitado atualmente às condiçãos binárias (estudos de caso/controle).

As doenças complexas com uma ligação genética são conduzi-

das geralmente por mais de um gene. Estes genes podem interagir de maneiras não-lineares, tornando-os mais difíceis de mapear usando métodos tradicionais. Trabalhando no nível de um par de indivíduos é possível fatorar o impacto de genes múltiplos devido a um locus estará ou contribuindo para o fenótipo naquele par de indivíduos ou não. O funcionamento completo deste processo é descrito abaixo. Após ter funcionado esta análise é possível extrair os alelos de risco em cada área e construir um modelo para prever o fenótipo usando outros métodos.

O algoritmo do "Mapeamento de Partição" realiza a varredura através do genoma parando a cada 50 kilobases. Em cada um destes pontos, cada par de indivíduos é analisado. Para cada par, os genótipos para o cromossomo inteiro são analisados comparando a probabilidade dos genótipos sob estes três possíveis cenários. O primeiro cenário é que há uma mutação recessiva conduzindo o fenótipo neste par de indivíduos. O segundo cenário é que há uma mutação dominante conduzindo o fenótipo neste par de indivíduos. O terceiro cenário é que não há nenhuma mutação importante para o fenótipo no par de cães nesta posição. As probabilidades são calculadas usando um modelo markov escondido, descrito abaixo. Comparando estas probabilidades é possível derivar um Fator Bayes para este par de indivíduos voltado para ou contra a presença de uma mutação que direciona o fenótipo recessivo ou dominante nesse ponto. O logarítimo destes valores é tomado; um valor positivo representa então mais peso voltado para o cenário de mutação recessiva ou dominante, um valor negativo representa mais evidência voltada para não existir nenhuma mutação importante aqui.

Os pares de indivíduos são classificados na ordem dos fatores do Logaritmo de Bayes naquele locus. Os pares dos Fatores de Logaritmo de Bayes são resumidos então em ordem decrescente tomando um registro de peso cumulativo da evidência em cada percentil de dados. Na maioria dos casos alguns Fatores de Logaritmo de Bayes serão positivos e alguns serão negativos. Isto dará o efeito do valor gravado aumentando para uma porcentagem de dados e que então cai. O máximo deste valor dá uma medida do peso da evidência voltada para os modelos recessivos ou dominantes.

Isto é referido como o 'valor de pico'.

Em alguns casos o algoritmo tem tendência voltada para áreas particularmente homozigóticas do genoma ou para áreas com uma alta densidade de polimorfismos. Este efeito é quantificado através do funcionamento do processo com cada par permutado através dos quatro estados possíveis de caso/controle (caso-caso, caso-controle, controle-caso, controle-controle). Para qualquer locus é subtraído o valor de pico sob o modelo permutado a partir do valor de pico normal, e este dá um valor de pico corrigido. Uma pessoa pode comparar o valor de pico corrigido através do genoma dando regiões de interesse.

Modelo Markov Escondido

Um elemento chave do Mapeamento de Partição é que o mesmo não atua diretamente nos dados do genótipo. Uma camada da análise que modela o grau de afinidade entre um par de cães é usada; esta análise dá a informação de quando dois indivíduos têm os mesmos alelos ancestrais em um locus em seu genoma.

Há nove relacionamentos possíveis entre os cromossomos em um par de cães, os mais relacionados sendo todos os quatro cromossomos do mesmo haplótipo, os menos relacionados sendo quatro haplótipos diferentes neste ponto. As probabilidades destes nove estados são calculadas usando um modelo markov escondido.

Alguns destes estados são impossíveis sob algumas permutações dos fenótipos de caso-controle se o locus estiver atuando nos pares dos indivíduos em questão. Por causa disso uma pessoa pode calcular Fatores de Bayes na presença de um alelo recessivo ou dominante a partir das probabilidades relativas.

Polimorfismos e suscetibilidade ao acúmulo de cobre

Usando o método descrito acima, os presentes inventores descobriram que os polimorfismos dentro dos ou na região dos genes GOLGA5, ATP7a e UBL5 caninos são indicativos da suscetibilidade ao acúmulo de cobre no fígado. A presente invenção refere-se consequentemente a um método para determinar a suscetibilidade de um cão ao acúmulo de cobre no

fígado usando um ou mais marcadores polimórficos nestas posições genômicas.

A presente invenção fornece um método para determinar a suscetibilidade de um cão ao acúmulo de cobre no fígado que compreende detectar a presença ou a ausência de (a) polimorfismo no gene GOLGA5, ATP7a ou UBL5 do cão que é indicativo da suscetibilidade ao acúmulo de cobre e/ou (b) um polimorfismo em desequilíbrio de ligação com um referido polimorfismo (a), e desse modo determinar a suscetibilidade do cão ao acúmulo de cobre no fígado.

A frase "detectar a presença ou a ausência de um polimorfismo" tipicamente significa determinar se um polimorfismo está presente no genoma do cão. Polimorfismos incluem Polimorfismos de Nucleotídeo Único (SNP), polimorfismos de microssatélite, polimorfismos de inserção e polimorfismos de deleção. Preferivelmente, o polimorfismo é um SNP. Detectar a presença ou ausência de um SNP significa genotipar o SNP ou a tipagem dos nucleotídeos presentes no genoma do cão para o SNP. Tipicamente, o nucleotídeo presente na mesma posição em ambos os cromossomos homólogos será determinado. Um cão pode portanto ser determinado como sendo homozigoto para um primeiro alelo, heterozigoto ou homozigoto para um segundo alelo do SNP.

Qualquer uma das posições polimórficas como definidas aqui podem ser tipadas diretamente, em outras palavras determinando o nucleotídeo presente naquela posição, ou indiretamente, por exemplo, determinando o nucleotídeo presente em uma outra posição polimórfica que esteja em desequilíbrio de ligação com a referida posição polimórfica. Estaria dentro da capacidade de uma pessoa versada usar técnicas rotineiras para identificar polimorfismos que estão em desequilíbrio de ligação com quaisquer outras das posições polimórficas como definido aqui.

Os polimorfismos que estão em desequilíbrio de ligação uns com os outros em uma população são encontrados tipicamente juntos no mesmo cromossomo. Tipicamente um polimorfismo é encontrado em pelo menos 30% das vezes, por exemplo, pelo menos 40%, pelo menos 50%, pelo me-

nos 70% ou pelo menos 90% das vezes, o outro é encontrado em um cromossomo particular em indivíduos na população. Assim um polimorfismo que não seja um polimorfismo de suscetibilidade funcional, mas está em desequilíbrio de ligação com um polimorfismo funcional, pode atuar como um marcador indicando a presença do polimorfismo funcional. Um polimorfismo que está em desequilíbrio de ligação com um polimorfismo da invenção é indicativo da suscetibilidade ao acúmulo de cobre no fígado.

Polimorfismos que estão em desequilíbrio de ligação com os polimorfismos mencionados aqui estão tipicamente localizados dentro de 9mb, preferivelmente dentro de 5mb, dentro de 2mb, dentro de lmb, dentro de 500kb, dentro de 400kb, dentro de 200kb, dentro de 100kb, dentro de 50kb, dentro de 10kb, dentro de 5kb, dentro de 1 kb, dentro de 500bp, dentro de 100bp, dentro de 50bp ou dentro de 10bp do polimorfismo.

A invenção envolve portanto detectar a presença ou a ausência (a) de um polimorfismo no gene GOLGA5, ATP7a ou UBL5 do cão de que é indicativo suscetibilidade ao acúmulo de cobre e/ou (b) um polimorfismo em desequilíbrio de ligação com um referido polimorfismo (a). Qualquer número e qualquer combinação de polimorfismo podem ser detectados para realizar a invenção. Preferivelmente, pelo menos 2 polimorfismos são detectados. Preferivelmente 2 a 5, 3 a 8 ou 5 a 10 polimorfismos são detectados.

O polimorfismo pode estar presente em qualquer um dos genes GOLGA5, ATP7a ou UBL5 ou pode não estar presente dentro de nenhum daqueles genes mas estar em desequilíbrio de ligação com um polimorfismo em qualquer um daqueles genes. Mais de um polimorfismo pode ser detectado que esteja em qualquer um daqueles genes ou esteja em desequilíbrio de ligação com eles. Os polimorfismos podem estar em qualquer combinação.

O DNA de um cão pode ser tipado nas posições respectivas de:

(i) dois ou mais polimorfismos (a);

(ii) dois ou mais polimorfismos (b); ou

(iii) um ou mais polimorfismos (a) e um ou mais polimorfismos (b).

Quando há dois polimorfismos (a), cada polimorfismo pode estar separado em um dos genes GOLGA5, ATP7a e UBL5 ou em apenas um daqueles genes. Quando há três ou mais polimorfismos (a), por exemplo, 3 a 10 de tais polimorfismos, os polimorfismos podem estar no mesmo gene, em dois dos genes ou em todos os três genes.

Similarmente, quando há dois polimorfismos (b), cada polimorfismo pode estar em desequilíbrio de ligação com um polimorfismo em separado em dos genes GOLGA5, ATP7a e UBL5 ou em apenas um daqueles genes. Quando há três ou mais polimorfismos (b), por exemplo, 3 a 10 de tais polimorfismos, os polimorfismos podem estar em desequilíbrio de ligação com um polimorfismo no mesmo gene, em dois dos genes ou em todos os três genes.

Um método preferido compreende a detecção da presença ou da ausência de pelo menos um polimorfismo (a) no gene GOLGA5, ATP7a ou UBL5 do cão que é indicativo da suscetibilidade ao acúmulo de cobre no fígado e de pelo menos um polimorfismo (b) em desequilíbrio de ligação com um referido polimorfismo (a).

Em um método preferido da invenção, o polimorfismo é um SNP. O SNP pode ser qualquer SNP no gene GOLGA5, ATP7a ou UBL5 do cão que é indicativo da suscetibilidade ao acúmulo de cobre e/ou um SNP que esteja em desequilíbrio de ligação com os mesmos. Preferivelmente, o SNP é selecionado de um SNP identificado na Tabela III e Tabela IV. Nas Tabelas III e IV, cada SNP está localizado na posição 61 na sequência. Os alelos do tipo selvagens e alternativos são fornecidos para cada SNP nessa posição. Qualquer número de SNPs pode ser usado a partir das Tabelas III e IV e em qualquer combinação. Os SNPs podem ser combinados com um tipo diferente de polimorfismo.

Preferivelmente, o método compreende a detecção da presença ou da ausência de um ou mais SNPs selecionados a partir dos SNPs na Tabela III e/ou um ou mais SNPs em desequilíbrio de ligação com os mesmos. Conformemente, qualquer um desses 5 SNPs ou quaisquer SNPs que estiverem em desequilíbrio de ligação com qualquer um desses 5 SNPs podem

ser tipados. Preferivelmente, pelo menos 2 destes 5 SNPs ou SNPs em desequilíbrio de ligação são tipados. Mais preferivelmente todas as 5 posições são tipadas. Portanto, preferivelmente, os nucleotídeos que são tipados são selecionados a partir das posições equivalentes a:

- posição 61 da SEQ ID NO: 1 (BICF2P506595, SNP1);
- posição 61 da SEQ ID NO: 2 (BICF2P772765, SNP 2);
- posição 61 da SEQ ID NO: 3 (BICF2S2333187, SNP 3);
- posição 61 da SEQ ID NO: 4 (BICF2P1324008, SNP 4);
- posição 61 da SEQ ID NO: 5 (BICF2P591872, SNP 5); ou

quaisquer posições que estejam em desequilíbrio de ligação com qualquer uma destas posições. Preferivelmente, o método compreende a detecção da presença ou da ausência do SNPs BICF2P506595 (SEQ ID NO: 1), BICF2P772765 (SEQ ID NO: 2), BICF2S2333187 (SEQ ID NO: 3), BICF2P1324008 (SEQ ID NO: 4), e BICF2P591872 (SEQ ID NO: 5).

SNP 1 está localizado dentro de um íntron do gene GOLGA5. Os SNPs 2, 3 e 4 estão localizados na região do gene UBL5. SNP 5 está localizado na região do gene de ATP7a. O método de detecção da invenção refere-se consequentemente a qualquer SNP que se encontrar dentro de ou na região de um ou mais destes genes (em regiões codificantes ou de outra maneira), ou qualquer outro SNP que estiver em desequilíbrio de ligação.

Tipando os nucleotídeos presentes no genoma do cão, em uma posição identificada na Tabela III ou IV, podem significar que o nucleotídeo presente nesta posição em uma sequência correspondendo exatamente com a sequência identificada na Tabela III ou IV é tipado. Entretanto, será entendido que as sequências exatas apresentadas na SEQ ID NO: 1 a 5 identificadas na Tabela III ou na SEQ ID NO: 6 a 129 na Tabela IV não estarão necessariamente presentes no cão a ser testado. A tipagem do nucleotídeo presente pode consequentemente ser em uma posição identificada na Tabela III ou IV ou em uma posição equivalente ou correspondente na sequência. O termo equivalente como usado aqui, portanto significa em ou em uma posição correspondente àquela identificada na Tabela III ou IV. A sequência e portanto a posição do SNP poderia, por exemplo, variar por causa das dele-

ções ou adições de nucleotídeos no genoma do cão. Aqueles versados na técnica poderão determinar uma posição que corresponda a ou seja equivalente à posição relevante em cada uma das SEQ ID NO: 1 a 129, usando, por exemplo, um programa de computador tal como GAP, BESTFIT, COMPARE, ALIGN, PILEUP ou BLAST. O Pacote UWGCG fornece os programas que incluem GAP, BESTFIT, COMPARE, ALIGN e PILEUP que podem ser usados para calcular a homologia ou o alinhamento das sequências (por exemplo, usado em seus ajustes de falha). O algoritmo de BLAST pode também ser usado para comparar ou alinhar duas sequências, tipicamente em seus ajustes de falha. O software para realizar uma comparação de BLAST de duas sequências está publicamente disponível através do Centro Nacional para a Informação de Biotecnologia (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/). Este algoritmo é ainda descrito abaixo. Ferramentas similares publicamente disponíveis para o alinhamento e comparação das sequências podem ser encontradas no website do Instituto Europeu de Bioinformática (http://www.ebi.ac.uk), por exemplo, os programas ALIGN e CLUSTALW.

Uma vez que a presença ou a ausência de um ou mais polimorfismos da invenção tenha sido detectada no genoma do cão, a suscetibilidade do cão ao acúmulo de cobre no fígado é desse modo determinada. O genótipo de cada polimorfismo sozinho ou em combinação com outros polimorfismos é indicativo da suscetibilidade do cão ao acúmulo de cobre no fígado. Como um exemplo, a Tabela I expõe os diferentes genótipos possíveis da combinação dos 5 SNPs na região dos genes GOLGA5, UBL5 e ATP7a e a porcentagem dos cães com aqueles genótipos que têm o cobre elevado (níveis no fígado acima de 600 mg/kg). Neste exemplo, para determinar a suscetibilidade de um cão ao acúmulo de cobre no fígado pode genotipar os 5 SNPs no genoma do cão usando uma amostra do DNA do cão. Uma vez que os genótipos dos SNPs tenham sido determinados, estes podem ser convertidos em valores binários baseados na chave fornecida pelo Exemplo 1, isto é, baseado no grau de associação do genótipo com o cobre elevado. Então, a Tabela I é usada para converter os valores binários em um fator de risco baseado na porcentagem dos cães que tem esse padrão de genótipo e

cobre elevado.

Um cão pode ser testado por um método da invenção em qualquer idade, por exemplo, de 0 a 12, de 0 a 6, de 0 a 5, de 0 a 4, de 0 a 3, de 0 a 2 ou de 0 a 1 anos de idade. Peferivelmente, o cão é testado quanto mais jovem possível, por exemplo, dentro do primeiro ano, dos primeiros 6 meses ou dos primeiros 3 meses de sua vida. O cão é preferivelmente testado antes que o acúmulo de cobre ocorra. A história do cão pode ou não pode ser conhecida. Por exemplo, o cão pode ser um filhote de pais conhecidos e a história dos pais no que diz respeito ao acúmulo de cobre pode ser conhecida. Alternativamente, o cão pode ser um cão perdido ou resgatado com parentesco e história desconhecidos.

O cão a ser testado por um método da presente invenção pode ser de qualquer raça. Tipicamente, o cão terá a herança genética de uma raça selecionada de Labrador Retriever, Doberman Pinscher, German Shepherd, Keeshond, Cocker Spaniel, West Highle White Terrier, Bedlington Terrier, e Skye Terrier. O cão pode ser um cão misturado ou cruzado, ou um cão híbrido ou sem raça. O cão pode ter pelo menos 25%, pelo menos 50%, ou pelo menos 100% de seu genoma herdado a partir de qualquer raça pura ou ainda a partir de algumas das raças descritas aqui. O cão pode ter pedigree. Em uma modalidade da invenção, um ou ambos os pais do cão a ser testado são ou eram cães com pedigree. Em uma outra modalidade, um ou mais avós são ou eram cães com pedigree. Um, dois, três ou todos os quatro avós do cão que é testado podem ser ou podem ter sido cães com pedigree.

Preferivelmente, o cão tem a herança genética da raça Labrador Retriever. O cão pode ser um Labrador Retriever com pedigree. Alternativamente, o cão pode ser um cão misturado ou cruzado, ou um cão sem raça (híbrido). Um ou ambos os pais do cão pode ser um cão Labrador Retriever com pedigree. Um, dois, três ou quatro dos avós do cão pode ser um cão Labrador Retriever com pedigree. O cão pode ter pelo menos 50% ou pelo menos 75% da raça Labrador Retriever em seu antecedente genético. Assim, pelo menos 50% ou pelo menos 75% do genoma do cão pode ser derivado da raça Labrador Retriever.

O antecedente genético da raça de um cão pode ser determinado avaliando as frequências alélicas de marcadores genéticos, por exemplo, SNPs ou microssatélites. As combinações das frequências alélicas de SNPs ou de microssatélites diferentes em um cão fornece uma assinatura que permite que a raça de um cão ou as raças que compõem um cão de raça misturada sejam determinadas. Tal teste genético pode ser um teste disponível no comércio. Alternativamente, o cão pode não precisar ser testado para a herança da raça Labrador Retriever porque é suspeito de ter uma herança da raça Labrador Retriever, por exemplo, pelo dono do cão ou pelo veterinário. Isto poderia ser, por exemplo, por causa do conhecimento da ascendência do cão ou por causa de sua aparência.

O teste preditivo da invenção pode ser realizado conjuntamente com um ou mais outros testes preditivos ou de diagnóstico tais como a determinação do antecedente genético do cão ou da suscetibilidade a uma ou mais outras doenças.

Detecção de polimorfismos

A detecção de polimorfismos de acordo com a invenção pode compreender por contactar um polinucleotídeo ou uma proteína do cão com um agente de ligação específico para um polimorfismo e determinar se o agente se liga ao polinucleotídeo ou à proteína, em que a ligação do agente indica a presença do polimorfismo, e a ausência de ligação do agente indica a ausência do polimorfismo.

O método é geralmente realizado *in vitro* em uma amostra do cão, onde a amostra contém o DNA do cão. A amostra compreende tipicamente um fluido corporal e/ou células do cão e pode, por exemplo, ser obtida usando um esfregaço, tal como um esfregaço de boca. A amostra pode ser uma amostra de sangue, urina, saliva, pele, célula da bochecha ou raiz de cabelo. A amostra é tipicamente processada antes que o método seja realizado, por exemplo, a extração do DNA pode ser realizada. O polinucleotídeo ou proteína na amostra pode ser clivada ou fisicamente ou quimicamente, por exemplo, usando uma enzima apropriada. Em uma modalidade, a parte do polinucleotídeo na amostra é copiada ou amplificada, por exemplo, por

clonagem ou usando um método baseado em PCR antes de detectar o polimorfismo.

Na presente invenção, qualquer um ou mais métodos podem compreender a determinação da presença ou da ausência de um ou mais polimorfismos no cão. O polimorfismo é tipicamente detectado determinando diretamente a presença da sequência polimórfica em um polinucleotídeo ou em uma proteína do cão. Tal polinucleotídeo é tipicamente DNA, mRNA ou cDNA genômico. O polimorfismo pode ser detectado por qualquer método apropriado tal como aqueles mencionados abaixo.

Um agente de ligação específico é um agente que se ligue com afinidade preferencial ou elevada à proteína ou ao polipeptídeo que tenha o polimorfismo, mas não se liga ou se liga com somente baixa afinidade a outros polipeptídeos ou proteínas. O agente de ligação específico pode ser uma sonda ou um iniciador. A sonda pode ser uma proteína (tal como um anticorpo) ou um oligonucleotídeo. A sonda pode ser marcada ou pode ser capaz de ser marcada indiretamente. A ligação da sonda ao polinucleotídeo ou à proteína pode ser usada para imobilizar ou a sonda ou o polinucleotídeo ou a proteína.

Geralmente no método, um polimorfismo pode ser detectado determinando a ligação do agente ao polinucleotídeo ou à proteína polimórfica do cão. Entretanto, em uma modalidade, o agente é também capaz de se ligar à sequência do tipo selvagem correspondente, por exemplo, se ligando aos nucleotídeos ou aos aminoácidos que flanqueiam a posição variante, embora a maneira da ligação à sequência do tipo selvagem seja detectavelmente diferente da ligação de um polinucleotídeo ou de uma proteína que contém o polimorfismo.

O método pode ser baseado em um ensaio de ligação de oligonucleotídeo em que duas sondas de oligonucleotídeo são usadas. Estas sondas se ligam a áreas adjacentes no polinucleotídeo que contêm o polimorfismo, permitindo, após ter se ligado às duas sondas, serem ligadas juntas por uma enzima ligase apropriada. Entretanto, a presença de um único desemparelhamento dentro de uma das sondas pode interromper a ligação.

As sondas assim ligadas irão somente ocorrer com um polinucleotídeo que contenha o polimorfismo, e portanto a detecção do produto ligado pode ser usada para determinar a presença do polimorfismo.

Em uma modalidade, a sonda é usada em um sistema baseado em análise de heterodúplex. Em tal sistema, quando a sonda é limitada a uma sequência de polinucleotídeo que contém o polimorfismo ele forma um heterodúplex no local onde o polimorfismo ocorre e então não forma uma estrutura de fita dupla. Tal estrutura de heterodúplex pode ser detectada pelo uso de uma enzima específica de fita única ou dupla. Tipicamente a sonda é uma sonda de RNA, a região heterodúplex é clivada usando RNAase H e o polimorfismo é detectado pela detecção dos produtos de clivagem.

O método pode ser baseado na análise de desemparelhamento de clivagem química fluorescente que é descrita, por exemplo, em PCR Methods e Applications 3, 268-71 (1994) e Proc. Natl. Acad. Sci. 85, 4397-4401 (1998).

Em uma modalidade, um iniciador de PCR é usado que inicie uma reação de PCR somente se liga a um polinucleotídeo que contém o polimorfismo, por exemplo, um sistema de PCR específico para sequência, e a presença do polimorfismo pode ser determinada pela detecção do produto de PCR. Preferivelmente, a região do iniciador que é complementar ao polimorfismo está na ou perto da extremidade 3' do iniciador. A presença do polimorfismo pode ser determinada usando um corante fluorescente e ensaio de PCR baseado em agente extintor tal como o sistema de detecção de PCR de Taqman.

O agente de ligação específico pode ser capaz de se ligar especificamente à sequência de aminoácido codificada por uma sequência polimórfica. Por exemplo, o agente pode ser um anticorpo ou um fragmento de anticorpo. O método de detecção pode ser baseado em um sistema ELISA. O método pode ser um sistema baseado em RFLP. Isto pode ser usado se a presença do polimorfismo no polinucleotídeo cria ou destrói um sítio de restrição que é reconhecido por uma enzima de restrição.

A presença do polimorfismo pode ser determinada baseada na

mudança que a presença do polimorfismo faz à mobilidade do polinucleotídeo ou da proteína durante a eletroforese em gel. No caso de um polinucleotídeo, o polimorfismo de conformação de fita única (SSCP) ou a análise de eletroforese em gel em gradiente de desnaturalização (DDGE) podem ser usados. Em um outro método para detectar o polimorfismo, um polinucleotídeo que compreende a região polimórfica é sequenciado através da região que contém o polimorfismo para determinar a presença do polimorfismo.

A presença do polimorfismo pode ser detectada por meio da transferência de energia da ressonância de fluorescência (FRET). Em particular, o polimorfismo pode ser detectado por meio de um sistema de sonda de hibridização duplo. Este método envolve o uso de duas sondas de oligonucleotídeo que são localizadas perto uma da outra e que são complementares a um segmento interno de um polinucleotídeo alvo de interesse, onde cada uma das duas sondas é marcada com um fluoróforo. Qualquer marcação ou corante fluorescente adequado pode ser usado como o fluoróforo, de forma que a emissão do comprimento de onda do fluoróforo em uma sonda (doador) sobrepõe o comprimento de onda de excitação do fluoróforo na segunda sonda (aceptor). Um fluoróforo doador típico é a fluoresceína (FAM), e os fluoróforos aceptores típicos incluem o vermelho do Texas, rodamina, LC-640, LC-705 e cianina 5 (Cy5).

A fim de que a transferência de energia da ressonância de fluorescência ocorra, os dois fluoróforos precisam entrar perto da proximidade da hibridização de ambas as sondas para o alvo. Quando o fluoróforo doador é excitado com um comprimento de onda de luz apropriado, a energia do espectro de emissão é transferida para o fluoróforo na sonda aceptora tendo por resultado sua fluorescência. Portanto, a detecção deste comprimento de onda da luz, durante a excitação no comprimento de onda apropriado para o fluoróforo doador, indica a hibridização e a associação próxima dos fluoróforos nas duas sondas. Cada sonda pode ser marcada com um fluoróforo em uma extremidade de forma que a sonda localizada à montante (5') é marcado em sua extremidade 3', e a sonda localizada a jusante (3') é marcada em sua extremidade 5'.

A abertura entre as duas sondas quando ligada à sequência alvo pode ser de 1 a 20 nucleotídeos, preferivelmente de 1 a 17 nucleotídeos, mais preferivelmente de 1 a 10 nucleotídeos, tal como uma abertura de 1, 2, 4, 6, 8 ou 10 nucleotídeos.

A primeira das duas sondas pode ser projetada para se ligar a uma sequência conservada do gene adjacente a um polimorfismo e a segunda sonda pode ser projetada para se ligar a uma região que inclui um ou mais polimorfismo. Os polimorfismos dentro da sequência do gene alvejado pela segunda sonda podem ser detectados medindo a mudança na temperatura de fusão causada pelos desemparelhamentos de base resultantes. A extensão da mudança na temperatura de fusão será dependente do número e dos tipos de base envolvidos nos polimorfismos do nucleotídeo.

A tipagem do polimorfismo pode também ser realizada usando uma técnica de extensão do iniciador. Nesta técnica, a região alvo que cerca o sítio polimórfico é copiada ou amplificada, por exemplo, usando o PCR. Uma reação de sequenciamento de base única é então realizada usando um iniciador que enrijece uma base longe do sítio polimórfico (incorporação do nucleotídeo específico para o alelo). O produto de extensão do iniciador é então detectado para determinar o nucleotídeo presente no sítio polimórfico. Há diversas maneiras em que o produto de extensão pode ser detectado. Em um método de detecção, por exemplo, os terminais de dideoxinucleotídeo marcados fluorescentemente são usados para parar a reação de extensão no sítio polimórfico. Alternativamente, os terminais de dideoxinucleotídeo modificados em massa são usados e os produtos de extensão do iniciador são detectados usando a espectrometria de massa. Marcando especificamente um ou mais dos terminais, a sequência do iniciador estendido, e então o nucleotídeo presente no sítio polimórfico pode ser deduzida. Mais de um produto de reação pode ser analisado por reação e consequentemente o nucleotídeo presente em ambos os cromossomos homólogos pode ser determinado se mais de um terminal é marcado especificamente.

A invenção ainda fornece iniciadores ou sondas que podem ser usadas na detecção de qualquer um dos SNPs definidos aqui para o uso na

predição da suscetibilidade ao acúmulo de cobre. Os polinucleotídeos da invenção podem também ser usados como iniciadores para que as reações de extensão de iniciador detectem os SNPs definidos aqui.

Tais iniciadores, sondas e outros fragmentos de polinucleotídeo serão preferivelmente pelo menos 10, preferivelmente pelo menos 15 ou pelo menos 20, por exemplo pelo menos 25, pelo menos 30 ou pelo menos 40 nucleotídeos em comprimento. Eles serão tipicamente até 40, 50, 60, 70, 100 ou 150 nucleotídeos em comprimento. As sondas e os fragmentos podem ser mais longos que 150 nucleotídeos em comprimento, por exemplo até 200, 300, 400, 500, 600, 700 nucleotídeos em comprimento, ou mesmo até alguns nucleotídeos, tais como cinco ou dez nucleotídeos, reduzida de uma sequência de polinucleotídeo do comprimento completo da invenção.

Os iniciadores e as sondas para genotipar os SNPs da invenção podem ser projetados usando qualquer software de projeto apropriado conhecido na técnica usando as sequências de SNP das Tabelas III e IV. Homólogos destas sequências de polinucleotídeo também seriam apropriados para projetar iniciadores e sondas. Tais homólogos têm tipicamente pelo menos 70% de homologia, preferivelmente pelo menos 80, 90%, 95%, 97% ou 99% de homologia, por exemplo, sobre uma região de pelo menos 15, 20, 30, 100 ou mais nucleotídeos contíguos. A homologia pode ser calculada com base na identidade do nucleotídeo (referida algumas vezes como a "homologia dura").

Por exemplo, o Pacote UWGCG fornece o programa BESTFIT que pode ser usado para calcular a homologia (por exemplo, usado em seus ajustes de falha) (Devereux *et al* (1984) *Nucleic Acids Research* **12**, p387-395). Os algoritmos PILEUP e BLAST podem ser usados para calcular a homologia ou alinhar as sequências (tais como a identificação de sequências equivalentes ou correspondentes (tipicamente em seus ajustes de falha), por exemplo, como descrito em Altschul S.F. (1993) J Mol Evol 36: 290 - 300; Altschul, S, F *et al* (1990) J Mol Biol 215: 403 - 10.

O software para realizar as análises de BLAST está publicamente disponível através do Centro Nacional para Informação de Biotecnologia

(http://www.ncbi.nlm.nih.gov/). Este algoritmo envolve primeiramente identificar pares de sequência de alta pontuação (HSPs) pela identificação de palavras curtas de comprimento W na sequência em questão que ou emparelhe ou satisfaça alguma pontuação mínima de valor positivo T quando alinhado com uma palavra de mesmo comprimento em uma sequência da base de dados. T é referido como a palavra vizinha de pontuação mínima (Altschul et al, supra). Estes acertos iniciais da palavra vizinha atuam como sementes para iniciar buscas para encontrar HSPs contendo-os. Os acertos de palavra são estendidas em ambas as direções no decorrer de cada sequência para tanto quanto a pontuação de alinhamento cumulativa possa ser aumentada. As extensões para os acertos de palavra em cada sentido são paradas quando: a pontuação de alinhamento cumulativa os cai pela quantidade X a partir de seu valor máximo alcançado; a pontuação cumulativa vai a zero ou abaixo, devido ao acúmulo de um ou mais alinhamentos de resíduo de pontuação negativa; ou o fim de uma ou outra sequência é alcançado. Os parâmetros W, T e X do algoritmo BLAST determinam a sensibilidade e a velocidade do alinhamento. O programa BLAST usa como falha um comprimento de palavra (W) de 11, a matriz de pontuação BLOSUM62 (veja Henikoff e Henikoff (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci.* USA 89: 10915 - 10919) alinhamentos (B) de 50, expectativa (E) de 10, M=5, N=4, e uma comparação de ambas as fitas.

O algoritmo de BLAST realiza uma análise estatística de similaridade entre duas sequências; veja, por exemplo, Karlin e Altschul (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 5873-5787. Uma medida de similaridade fornecida pelo algoritmo BLAST é a probabilidade da menor soma (P(N)), que fornece uma indicação da probabilidade pela qual um emparelhamento entre duas sequências de polinucleotídeo ocorreria por acaso. Por exemplo, uma sequência é considerada similar a uma outra sequência se a probabilidade da menor soma na comparação da primeira sequência com a segunda sequência for menor do que cerca de 1, preferivelmente menor do que cerca de 0,1, mais preferivelmente menor do que cerca de 0,01, e ainda mais preferivelmente menor do que cerca de 0,001.

A sequência homóloga tipicamente difere por pelo menos 1, 2, 5, 10, 20 ou mais mutações, que podem ser substituições, deleções ou inserções de nucleotídeos.

Os polinucleotídeos da invenção tais como iniciadores ou sondas podem estar presentes em uma forma isolada ou substancialmente purificada. Eles podem ser misturados com veículos ou diluentes que não irão interferir em seu uso pretendido e ainda serão considerados como substancialmente isolados. Eles também podem estar em uma forma substancialmente purificada, no qual eles irão geralmente compreender pelo menos 90%, por exemplo, pelo menos 95%, 98% ou 99%, dos polinucleotídeo da preparação.

Anticorpos detectores

Um anticorpo detector é um anticorpo que seja específico para um polimorfismo, mas não se liga a nenhum outro polimorfismo como descrito aqui. Os anticorpos detectores são, por exemplo, úteis nos métodos de purificação, isolamento ou seleção que envolvem técnicas de imunoprecipitação.

Os anticorpos podem ser colocados contra epítopos específicos dos polipeptídeos da invenção. Um anticorpo, ou outro composto, "se liga especificamente" a um polipeptídeo quando se liga com afinidade preferencial ou elevada à proteína para a qual é específica, mas não se liga substancialmente ou se liga com somente baixa afinidade a outros polipeptídeos. Uma variedade de protocolos para ligação competitiva ou ensaios imunorradiométricos para determinar a capacidade de ligação específica de um anticorpo são conhecidos na técnica (veja, por exemplo, Maddox *et al*, J. Exp. Med. 158, 1211-1226, 1993). Tais imunoensaios tipicamente envolvem a formação de complexos entre a proteína específica e seu anticorpo e a medida da formação do complexo.

Para as finalidades desta invenção, o termo "anticorpo", a menos que especificado pelo contrário, inclui os fragmentos que se ligam a um polipeptídeo da invenção. Tais fragmentos incluem os fragmentos Fv, F(ab') e $F(ab')_2$, assim como anticorpos de cadeia única. Além disso, os anticorpos

e fragmentos dos mesmos podem ser anticorpos quiméricos, anticorpos CDR-transplantados ou anticorpos humanizados.

Os anticorpos podem ser usados em um método para detectar os polipeptídeos da invenção em uma amostra biológica (tal como qualquer uma amostra mencionada aqui), cujo método compreende:

I fornecimento de um anticorpo da invenção;

II incubação de uma amostra biológica com o referido anticorpo sob condições que permitem a formação de um complexo anticorpo-antígeno; e

III determinação de se o complexo anticorpo-antígeno compreendendo o referido anticorpo é formado.

Os anticorpos da invenção podem ser produzidos por qualquer método apropriado. Os meios para preparar e caracterizar os anticorpos são bem-conhecidos na técnica, veja, por exemplo, Harlow e Lane (1988) "Antibodies: A Laboratory Manual", Cold Spring Habor Laboratory Press, Cold Spring Habor, NY. Por exemplo, um anticorpo pode ser produzido colocando um anticorpo em um animal hospedeiro contra o polipeptídeo inteiro ou um fragmento do mesmo, por exemplo, um epítopo antigênico do mesmo, de aqui em diante o "imunógeno". O fragmento pode ser qualquer um dos fragmentos mencionados aqui (tipicamente pelo menos 10 ou pelo menos 15 aminoácidos de comprimento).

Um método para produzir um anticorpo policlonal compreende a imunização de um animal hospedeiro apropriado, por exemplo, um animal experimental, com o imunógeno e isolando imunoglobulinas do soro do animal. O animal pode consequentemente ser inoculado com o imunógeno, o sangue subsequentemente removido do animal e a fração de IgG purificada. Um método para produzir um anticorpo monoclonal compreende as células imortalizadas que produzem o anticorpo desejado. As células do hibridoma podem ser produzidas fundindo células do baço de um animal experimental inoculado com células de tumor (Kohler e Milstein (1975) *Nature* **256**, 495-497).

Uma célula imortalizada que produz o anticorpo desejado pode

ser selecionada por um procedimento convencional. Os hibridomas podem ser crescidos em cultura ou ser injetados intraperitonealmente para a formação de fluido de ascites ou no fluxo sanguíneo de um hospedeiro alogênico ou um hospedeiro imunocomprometido. O anticorpo humano pode ser preparado pela imunização *in vitro* de linfócitos humanos, seguida pela transformação dos linfócitos com o vírus de Epstein-Barr.

Para a produção de ambos os anticorpos monoclonais e policlonais, o animal experimental é apropriadamente uma cabra, um coelho, um rato, um camundongo, um porquinho-da-índia, uma galinha, um carneiro ou um cavalo. Se desejado, o imunógeno pode ser administrado como um conjugado em que o imunógeno é acoplado, por exemplo, através de uma cadeia lateral de um dos resíduos de aminoácido, a um veículo apropriado. A molécula veículoa é tipicamente um veículo fisiologicamente aceitável. O anticorpo obtido pode ser isolado e, se desejado, purificado.

Kit de detecção

A invenção também fornece um kit que compreende meios para tipar um ou mais dos polimorfismos definidos aqui. Em particular, tais meios podem incluir um agente de ligação específico, sonda, iniciador, par ou combinação de iniciadores, ou anticorpo, incluindo um fragmento de anticorpo, como definido aqui o qual é capaz de detectar ou de ajudar na detecção dos polimorfismos definidos aqui. O iniciador ou par ou combinação de iniciadores podem ser iniciadores específicos de sequência que somente causam a amplificação de PCR de uma sequência de polinucleotídeo que compreende o polimorfismo a ser detectado, como discutido aqui. O iniciador ou par de iniciadores podem alternativamente não serem específicos para o nucleotídeo polimórfico, mas podem ser específicos para a região a montante (5') e/ou a jusante (3'). Estes iniciadores permitem a região que abrange o nucleotídeo polimórfico ser copiada. Um kit apropriado para o uso na técnica de extensão do iniciador pode especificamente incluir trifosfatos de dideoxinucleotídeo marcados (ddNTPs). Estes podem, por exemplo, ser fluorescentemente marcados ou ter a massa modificada para permitir a detecção do produto de extensão e consequentemente a determinação do nucleotídeo

presente na posição polimórfica.

O kit pode também compreender um agente de ligação específico, uma sonda, um iniciador, um par ou uma combinação de iniciadores, ou um anticorpo que é capaz de detectar a ausência de polimorfismo. O kit pode ainda compreender tampões ou soluções aquosas.

O kit pode adicionalmente compreender um ou mais outros reagentes ou instrumentos que permitem qualquer uma das modalidades do método mencionado acima a ser realizado. Tais reagentes ou instrumentos podem incluir um ou mais dos seguintes: um meio para detectar a ligação do agente ao polimorfismo, uma marcação detectável tal como uma marcação fluorescente, uma enzima capaz de atuar em um polinucleotídeo, tipicamente uma polimerase, enzima de restrição, ligase, RNAse H ou uma enzima que possa unir uma marcação a um polinucleotídeo, tampões apropriados ou soluções aquosas para reagentes de enzima, iniciadores de PCR que se ligam às regiões que flanqueiam o polimorfismo como discutido aqui, um controle positivo e/ou negativo, um aparelho de eletroforese em gel, um meio para isolar o DNA da amostra, um meio para obter uma amostra do indivíduo, tal como um esfregaço ou um instrumento que compreende uma agulha, ou um suporte compreendendo poços nos quais as reações de detecção podem ser realizadas. O kit pode ser, ou incluir, um ensaio tal como um ensaio de polinucleotídeo compreendendo o agente de ligação específico, preferivelmente uma sonda, da invenção. O kit tipicamente inclui um conjunto de instruções para usar o kit.

Bioinformática

As sequências dos polimorfismos podem ser armazenadas em um formato eletrônico, por exemplo, em uma base de dados de computador. Conformemente, a invenção fornece uma base de dados que compreende a informação relativa a um ou mais polimorfismos nos genes GOLGA5, ATP7a ou UBL5 e/ou um ou mais polimorfismos em desequilíbrio de ligação dos mesmos e sua associação com a suscetibilidade de um cão ao acúmulo de cobre no fígado. A base de dados pode incluir informações adicionais sobre o polimorfismo, por exemplo, o grau de associação do polimorfismo com a

suscetibilidade ao acúmulo de cobre no fígado.

Uma base de dados como descrita aqui pode ser usada para prever a suscetibilidade de um cão ao acúmulo de cobre no fígado. Tal determinação pode ser realizada por meios eletrônicos, por exemplo, usando um sistema de computador (tal como um PC). Tipicamente, a determinação será realizada pela entrada de dados genéticos do sistema de computador a partir do cão em um sistema de computador; comparando os dados genéticos com uma base de dados que compreende informação em relação a um ou mais polimorfismos nos genes GOLGA5, ATP7a ou UBL5 e/ou em um ou mais polimorfismos em desequilíbrio de ligação dos mesmos e sua associação com a suscetibilidade de um cão ao acúmulo de cobre no fígado; e na base desta comparação, prever a suscetibilidade do cão ao acúmulo de cobre no fígado. Esta informação pode então ser usada para guiar a gerência dos níveis de cobre no fígado do cão.

A invenção também fornece um programa de computador compreendendo meios do código de programa para a execução de todas as etapas de um método da invenção quando o referido programa funciona em um computador. Também é fornecido um produto do programa de computador que compreende os meios do código do programa armazenados em um meio legível por computador para realizar um método da invenção quando o referido programa funciona em um computador. Um produto do programa de computador compreendendo os meios do código do programa em uma onda de veículo que, quando realizados em um sistema de computador, instruem o sistema de computador para realizar um método da invenção é fornecido adicionalmente.

Como ilustrado na figura 4, a invenção também fornece um aparelho arranjado para realizar um método de acordo com a invenção. O aparelho compreende tipicamente um sistema de computador, tal como um PC. Em uma modalidade, o sistema de computador compreende: meios 20 para receber dados genéticos do cão; um módulo 30 para comparar os dados com uma base de dados 10 compreendendo informação em relação aos polimorfismos; e meios 40 para prever com base na referida comparação da

suscetibilidade do cão ao acúmulo de cobre no fígado.

Gêneros alimentícios da invenção

A presente invenção está relacionada com gêneros alimentícios para os cães que têm a herança genética da raça Labrador Retriever. Os inventores descobriram que o nível de cobre encontrado em dietas comerciais está associado com o acúmulo de cobre no fígado dentro de Labradores Retriever e que reduzindo o nível de cobre na dieta surpreendentemente permite o nível de cobre no fígado ser trazido para um nível normal mais eficientemente do que o fármaco penicilamina. Os gêneros alimentícios da invenção têm uma baixa concentração de cobre, especificamente uma concentração de cobre menor que 21 mg/kg de matéria seca. Os gêneros alimentícios são usados para prevenir o acúmulo de cobre nos fígados de Labradores Retriever. São consequentemente úteis para prevenir uma doença ou uma condição atribuível ao acúmulo de cobre no fígado. O termo "gênero alimentício" como usado aqui cobre gêneros alimentícios, diet, comestíveis ou suplementos. Quaisquer dessas formas podem ser sólidas, semissolidas ou líquidas.

Mais detalhadamente, os gêneros alimentícios da invenção compreendem o cobre em uma concentração menor que 21 mg/kg. Preferivelmente, a concentração de cobre é menor que 20, menor que 17, menor que 15, menor que 12 ou menor que 10 mg/kg de matéria seca. Preferivelmente, a concentração de cobre é pelo menos 4,5, pelo menos 4,75, pelo menos 5 ou pelo menos 8 mg/kg de matéria seca. Tipicamente, a concentração de cobre está na faixa de 4,5 a 21 mg/kg, 5 a 17 mg/kg ou de 10 a 15 mg/kg de matéria seca. O cobre pode estar presente nos gêneros alimentícios em qualquer forma fisiologicamente aceitável, por exemplo, como o sulfato de cobre.

Os gêneros alimentícios podem ainda compreender o zinco em uma concentração de pelo menos 120 mg/kg de matéria seca. Preferivelmente, a concentração de zinco é pelo menos 150, pelo menos 180 ou pelo menos 200 mg/kg de matéria seca. Preferivelmente a concentração de zinco não excede o máximo permitido pelas autoridades reguladoras de alimento.

Tipicamente, a concentração de zinco é menor que 250, menor que 240, menor que 230, ou menor que 220 mg/kg de matéria seca. Tipicamente, a concentração de zinco estará na faixa de 120 a 250, 150 a 250 ou 200 a 250 mg/kg de matéria seca.

O zinco pode ser fornecido nos mesmos gêneros alimentícios que fornecem o nível de cobre da invenção. Alternativamente, o zinco pode ser fornecido sob a forma de um suplemento, o qual pode ser adicionado a gêneros alimentícios da invenção. Um suplemento pode ser sob a forma de uma formulação de comprimido, pó ou líquido. O zinco pode ser fornecido sob a forma de qualquer sal fisiologicamente aceitável. Os exemplos de fontes de zinco incluem o acetato de zinco, sulfato de zinco, gluconato de zinco, carbonato de zinco, cloreto de zinco e óxido de zinco.

A concentração de cobre ou de zinco nos gêneros alimentícios é descrita aqui em uma base de matéria seca, isto é com base nos gêneros alimentícios sem água, para permitir a comparação direta entre os gêneros alimentícios diferentes que podem ter o índice de umidade diferente. Para medir a concentração de cobre ou de zinco em gêneros alimentícios úmidos ou semiúmidos, uma amostra do gêneros alimentícios é primeiramente seca, por exemplo, usando um forno, para remover a água. Depois disso, alguma técnica adequada pode ser usada para medir a concentração de cobre ou de zinco na amostra dos gêneros alimentícios secos. Um exemplo de tal técnica que é bem-conhecida na técnica é a espectrofotometria de absorção atômica da flama.

Os gêneros alimentícios da invenção podem estar sob a forma de, por exemplo, um alimento de animal de estimação úmido, um alimento de animal de estimação semiúmido ou um alimento de animal de estimação seco. O alimento de animal de estimação úmido tem geralmente um índice de umidade acima de 65% por peso. O alimento de animal de estimação semiúmido tem tipicamente um índice de umidade entre 20-65% por peso e pode incluir umectantes e outros ingredientes para prevenir o crescimento microbiano. O alimento de animal de estimação seco, também chamado kibble, tem geralmente um índice de umidade abaixo de 20% por peso e seu processamento tipicamente inclui expulsar, secar e/ou cozinhar no calor.

Os gêneros alimentícios podem ser fornecidos como uma mistura de alimento seco e molhado. Tal combinação pode ser fornecida pré-misturada ou pode ser pelo fornecimento como dois ou mais gêneros alimentícios separados, os quais são fornecidos ao cão separadamente, simultaneamente ou sequencialmente.

Os gêneros alimentícios abrangem qualquer produto que o cão consumir em sua dieta. A invenção cobre produtos de alimento padrão assim como petiscos de alimento do animal de estimação. Os gêneros alimentícios são preferivelmente um produto cozido. Eles podem incorporar carne ou material derivado de animal (tal como bife, galinha, peru, cordeiro, peixe etc.). O produto pode alternativamente ser livre de carne (preferivelmente incluindo um substituto de carne tal como soja, glúten de milho ou um produto da soja a fim de fornecer uma fonte de proteína). O produto pode também conter uma fonte de amido tal como um ou mais grãos (por exemplo milho, arroz, aveia, cevada etc.), ou pode ser livre de amido.

Os ingredientes de um alimento seco de animal de estimação podem ser selecionados de cereal, grão, carne, aves, gordura, vitamina e mineral. Os ingredientes são tipicamente misturados e postos através de um extrusor/fogão. O produto é então tipicamente formatado e secado, e após a secagem, sabores e gorduras podem ser revestidos ou pulverizados sobre o produto seco.

Todos os alimentos de animal de estimação são exigidos fornecer um determinado nível de nutrientes. Por exemplo, a Association of American Feed Control Officials (AAFCO) e o Pet Food Institute estabeleceram os perfis de nutrientes para alimentos de cão, baseados em ingredientes comumente usados. Estes perfis estabelecidos são chamados os "perfis de nutriente de alimento de cão AAFCO". Sob estes regulamentos, os alimentos de cão devem ser formulados para conter concentrações de nutrientes que estão de acordo com todos os níveis mínimos e não excedem os níveis máximos como determinados pela AAFCO.

A formulação do alimento de cão pode ser personalizada de acordo com as exigências calóricas, de proteína, de gordura, de carboidrato,

de fibra, de vitamina ou de mineral do cão. Por exemplo, a formulação do alimento de cão pode ser personalizada para fornecer as quantidades ou a razão correta de ácidos graxos essenciais tais como os ácidos graxos ômega-6 e ômega-3. As principais fontes de ácidos graxos ômega-6 são plantas tais como girassol, óleo de soja, açafroa e óleo de prímula, enquanto os ácidos graxos ômega-3 são encontrados principalmente na linhaça e em fontes marinhas. Os ingredientes de alimento que têm cobre elevado e podem ser evitados na produção de gêneros alimentícios incluem frutos do mar, fígado, rim, coração, carne, nozes, cogumelos, cereais, cacau, leguminosas e água branda (tubulações de cobre). Os ingredientes de alimento que são ricos em zinco e podem ser incluídos na formulação incluem leite, gelatina, gemas de ovo, arroz e batatas.

Os gêneros alimentícios são preferivelmente empacotados. O empacotamento pode ser de metal (geralmente na forma de uma lata ou de um flexifoil), plástico (geralmente sob a forma de uma bolsa ou de uma garrafa), papel ou cartão. A quantidade de umidade em qualquer produto pode influenciar no tipo de empacotamento, que pode ser usado ou é exigido.

Os gêneros alimentícios da invenção podem ser empacotados junto com uma fonte de zinco. O zinco pode ser fornecido em qualquer forma. O zinco pode ser fornecido dentro de um ou mais gêneros alimentícios ou sob a forma de um suplemento separado que é empacotado com os gêneros alimentícios compreendendo o nível máximo de cobre da invenção. Quando o zinco é fornecido dentro de um gênero alimentício, ele pode ser fornecido dentro do mesmo gênero alimentício que contêm o nível particular de cobre da invenção ou ele pode ser fornecido em um ou mais gêneros alimentícios separados ou em ambos. A invenção fornece consequentemente uma embalagem que compreende um gênero alimentício que têm o cobre em uma concentração de menos que 21 mg/kg de matéria seca e um suplemento de zinco. O suplemento de zinco fornece uma concentração de pelo menos de 120 mg/kg de matéria seca quando adicionado ao gênero alimentício. O gênero alimentício e o suplemento de zinco são para uso simultâneo, separado ou sequencial na prevenção de uma doença atribuível

ao acúmulo de cobre no fígado em um cão que tem a herança genética da raça Labrador Retriever.

A invenção também fornece um gênero alimentício marcado como discutidos aqui. A marcação pode, por exemplo, indicar que o gênero alimentício é apropriado para um cão da raça Labrador Retriever. Outras indicações ou instruções podem ser fornecidas. Por exemplo, a quantidade de cobre e/ou de zinco que a dieta ou os gêneros alimentícios contêm, em adição a outros ingredientes, pode ser indicado. Além disso, instruções de alimentação podem ser fornecidas.

Labrador Retriever

Os gêneros alimentícios da invenção são apropriados para prevenir o acúmulo de cobre no fígado em um cão que tem a herança genética da raça Labrador Retriever. O cão é tipicamente um cão de companhia ou um animal de estimação. O cão pode ser um Labrador Retriever com pedigree. Alternativamente, o cão pode ser um cão de raça cruzada ou misturado, ou um cão outbred (híbrido). Um ou ambos os pais do cão pode ser um cão Labrador Retriever com pedigree. Um, dois, três ou quatro dos avós do cão pode ser um cão Labrador Retriever com pedigree. O cão pode ter pelo menos 50% ou pelo menos 75% da raça Labrador Retriever em seu antecedente genético. Assim, pelo menos 50% ou pelo menos 75% do genoma do cão pode ser derivado da raça Labrador Retriever.

O antecedente genético da raça de um cão pode ser determinado avaliando frequências alélicas dos marcadores genéticos, por exemplo, SNPs ou microssatélites. As combinações de frequências alélicas de SNPs ou de microssatélites diferentes em um cão fornecem uma assinatura que permitam a raça de um cão ou as raças que compõem um cão de raça misturada a ser determinada. Tal teste genético pode ser um teste comercialmente disponível.

Alternativamente, o cão pode não precisar ser testado para herança da raça Labrador Retriever porque é suspeitado de ter uma herança da raça Labrador Retriever, por exemplo, pelo proprietário ou pelo veterinário do cão. Isto poderia ser, por exemplo, por causa do conhecimento dos

ancestrais do cão ou por causa de sua aparência.

O alimento é apropriado para um cão de qualquer idade. O alimento pode ser apropriado para um cão que tem uma idade de 0 a 12 anos de idade, por exemplo, 1 a 5 anos de idade, 2 a 7 anos de idade ou 3 a 9 anos de idade.

Geralmente, os gêneros alimentícios são apropriados para um cão saudável. É apropriado para um cão que não tenha um acúmulo de cobre hepático detectável. Os gêneros alimentícios são pretendidos para uso profilático, isto é, prevenir o acúmulo de cobre no fígado de um cão. Os gêneros alimentícios são pretendidos para minimizar o risco do acúmulo de cobre e desse modo reduzir a probabilidade do cão de desenvolver uma doença ou uma condição atribuível ao acúmulo de cobre no fígado, tal como hepatite crônica, cirrose ou falência hepática. Tipicamente, os gêneros alimentícios são para o uso na prevenção do acúmulo de cobre em um cão que não tenha uma concentração de cobre hepática anormal e é consequentemente não provável de estar em risco de sofrimento de hepatite associada ao cobre. O cão pode também não ter nenhuma história de acúmulo de cobre. O cão, portanto, preferivelmente tem um nível normal de cobre hepático na faixa de menos do que cerca de 400 mg/kg de peso seco do fígado. Entretanto, em cães recém-nascidos o nível normal de cobre hepático pode ser considerado como sendo menos do que cerca de 600 mg/kg de peso seco do fígado. O objetivo de fornecer os gêneros alimentícios ao cão é prevenir que a concentração de cobre hepático alcance níveis significativamente mais altos do que o nível normal. Os métodos que podem ser usados para determinar a concentração de cobre no fígado de um cão são bem-conhecidos na técnica. Um método apropriado é descrito no Exemplo 1.

Os gêneros alimentícios podem ser usados para prevenir hepatite crônica associada ao cobre. Os gêneros alimentícios são preferivelmente para o uso na prevenção do acúmulo de cobre em um cão que não tenha doença hepática detectável, com o objetivo de prevenir tal doença hepática. Os gêneros alimentícios podem também ser usados para tratar uma doença ou condição atribuível ao acúmulo de cobre no fígado, tal como hepatite crô-

nica, cirrose ou falência hepática. A evidência ou os sintomas de doença no fígado incluem indicações clínicas tais como letargia, diarreia e icterícia. As indicações bioquímicas de doença hepática incluem bilirrubina anormalmente aumentada no soro e atividades de enzima hepática no soro tais como a fosfatase alcalina (ALP), a alanina aminotransferase (ALT), a aspartato aminotransferase (AST) e a gama-glutamil transpeptidase. A medida bioquímica de tais indicadores de doença hepática é conhecida na técnica.

Fabricação do alimento

Os gêneros alimentícios da invenção podem ser feitos misturando junto os ingredientes apropriados. A fabricação é controlada de modo que os gêneros alimentícios tenham a concentração de cobre exigida. A concentração de cobre pode ser monitorada durante o processo de produção dos gêneros alimentícios. A invenção, portanto, fornece um método para fazer os gêneros alimentícios da invenção que compreende misturar junto os ingredientes para os gêneros alimentícios de modo que os gêneros alimentícios tenham uma concentração de cobre menor que 21 mg/kg de matéria seca. Um ou mais dos componentes a serem incorporados nos gêneros alimentícios podem fornecer uma fonte de cobre. Entretanto, é importante evitar o uso de componentes que são prováveis de serem ricos em cobre. Os ingredientes de alimento que são elevados em cobre e podem ser evitados na produção dos gêneros alimentícios incluem frutos do mar, fígado, rim, coração, carne, nozes, cogumelos, cereais, cacau, leguminosas e água branda (tubulações de cobre). Opcionalmente, um ou mais dos componentes irão fornecer uma fonte de zinco para os gêneros alimentícios da invenção. Ingredientes de alimentos que são ricos em zinco e podem ser incluídos na formulação incluem leite, gelatina, gemas de ovo, arroz e batatas. Os componentes/ingredientes podem ser adicionados em qualquer momento durante a fabricação/processamento dos gêneros alimentícios.

É importante medir a concentração de cobre que está presente nos gêneros alimentícios para determinar que a concentração está abaixo do limite de acordo com a invenção. A concentração de zinco poderia também ser medida para certificar que esteja acima do nível mínimo que é preferido

de acordo com a invenção. Uma das etapas no método da fabricação dos gêneros alimentícios pode compreender a medição da concentração de cobre em uma amostra dos gêneros alimentícios. Pelo menos uma medida da concentração de cobre pode ser feita a partir de uma amostra dos gêneros alimentícios depois que os gêneros alimentícios tenham sido preparados. As medidas poderiam também ser feitas durante a preparação dos gêneros alimentícios a fim de monitorar os níveis de cobre e/ou de zinco que estão acumulando pela adição de ingredientes adicionais. Por exemplo, uma medida poderia ser feita em uma amostra após a adição de um ou mais ingredientes. Medidas de cobre, zinco e outros elementos podem ser feitas em uma amostra usando qualquer método apropriado conhecido na técnica tal como a espectrofotometria de absorção atômica de flama.

Tipicamente, o método para fazer os gêneros alimentícios da invenção compreende as etapas de misturar junto os ingredientes com o cozimento opcional de quaisquer ingredientes crus; medir a concentração de cobre, e opcionalmente de zinco, em uma amostra dos gêneros alimentícios; e empacotar os gêneros alimentícios. O método para fazer os gêneros alimentícios pode ainda compreender fornecer proprietário do cão, a pessoa responsável pela alimentação do cão ou um veterinário, com os gêneros alimentícios e/ou fornecer os gêneros alimentícios ao cão.

Enquanto seria incomum para um gênero alimentício não conter nenhum cobre, o cobre poderia ser adicionado como um suplemento aos gêneros alimentícios a fim alcançar a exigência diária mínima de cobre na dieta do cão (por exemplo, como recomendado pela American Feed Control Official (AAFCO)) enquanto ainda mantendo a concentração de cobre em um nível abaixo daquele exigido pela invenção. A invenção consequentemente também fornece o uso do cobre na fabricação de um gênero alimentício para um cão que tem a herança genética da raça Labrador Retriever, onde os gêneros alimentícios compreendem o cobre em uma concentração de menos que 21 mg/kg e são para o uso na prevenção do acúmulo de cobre no referido cão. O cobre pode ser adicionado aos gêneros alimentícios em qualquer forma apropriada. Os exemplos dos suplementos de cobre in-

cluem cloreto cúprico e sulfato cúprico pentahidratado.

O aparelho de fabricação do produto de alimento usado na presente invenção compreende tipicamente um ou mais dos seguintes componentes: recipiente para ingredientes secos de alimento de animal de estimação; recipiente para líquidos; misturador; molde e/ou extrusor; dispositivo de interrupção; meios de cozimento (por exemplo, forno); refrigerador; meios de empacotamento; e meios de marcação. Um recipiente para ingrediente seco tipicamente tem uma abertura na parte inferior. Esta abertura pode ser coberta por um elemento regulador de volume, tal como uma fechadura giratória. O elemento regulador de volume pode ser aberto e fechado de acordo com as instruções de fabricação eletrônica para regular a adição de ingredientes secos ao alimento do animal de estimação. Os ingredientes secos tipicamente usados na fabricação do alimento de animal de estimação incluem milho, trigo, carne e/ou aves. Ingredientes líquidos tipicamente usados na fabricação do alimento de animal de estimação incluem gordura, sebo e água. Um recipiente para líquido pode conter uma bomba que possa ser controlada, por exemplo, pelas instruções de fabricação eletrônica, para adicionar uma quantidade medida de líquido ao alimento do animal de estimação.

Em uma modalidade, os recipientes do ingrediente seco e os recipientes de líquido são acoplados a um misturador e entregam quantidades específicas de ingredientes secos e líquidos ao misturador. O misturador pode ser controlado pelas instruções de fabricação eletrônica. Por exemplo, a duração ou a velocidade da mistura pode ser controlada. Os ingredientes misturados são então tipicamente entregues a um molde ou a um extrusor. O molde/extrusor pode ser qualquer molde ou extrusor conhecido na técnica que pode ser usado para dar forma aos ingredientes misturados na forma exigida. Tipicamente, os ingredientes misturados são forçados através de uma abertura restrita sob pressão para formar a uma fita contínua. Enquanto a fita é extrusada, ela pode ser cortada em pedaços (kibbles) por um dispositivo de interrupção, tal como uma faca. Kibbles são tipicamente cozidos, por exemplo, em um forno. O tempo e a temperatura de cozimento podem ser controlados pelas instruções de fabricação eletrônica. O tempo de cozimento

pode ser alterado a fim de produzir o conteúdo de umidade desejado para o alimento. Os kibbles cozidos podem então ser transferidos a um refrigerador, por exemplo, uma câmara contendo um ou mais ventiladores.

O aparelho de fabricação do alimento de animal de estimação pode compreender um aparelho de empacotamento. O aparelho de empacotamento tipicamente empacota o alimento de animal de estimação em um recipiente tal como um plástico ou saco de papel ou caixa. O aparelho pode também compreender meios para marcar o alimento de animal de estimação, tipicamente depois que o alimento tenha sido empacotado. A marcação pode indicar o tipo de cão que os gêneros alimentícios são apropriados para (isto é, Labrador Retriever), e/ou os ingredientes do alimento.

Uso dos gêneros alimentícios

Os gêneros alimentícios da invenção podem ser usados para prevenir o acúmulo de cobre no fígado em um cão. Portanto, podem ser usados para prevenir uma doença ou uma condição associada com o cobre elevado no fígado tal como hepatite crônica associada ao cobre, cirrose ou falência hepática. Conformemente, a invenção fornece um método para prevenir o acúmulo de cobre no fígado e uma doença atribuível ao acúmulo de cobre no fígado em um cão que tem a herança genética da raça Labrador Retriever, compreendendo alimentar o cão com os gêneros alimentícios como descritos aqui. A invenção também fornece um método para prevenir hepatite crônica associada ao cobre em um cão que tem a herança genética da raça Labrador Retriever que compreende o fornecimento dos gêneros alimentícios da invenção ao cão. Os gêneros alimentícios da invenção são tipicamente para uso profilático na prevenção do acúmulo de cobre em Labradores Retriever. Eles também são tipicamente para prevenir hepatite crônica associada ao cobre em Labradores Retriever.

Preferivelmente, os gêneros alimentícios da invenção são para uso na prevenção do acúmulo de cobre no fígado em um cão determinado a ser suscetível ao acúmulo de cobre no fígado pelo teste genético descrito aqui.

O uso dos gêneros alimentícios da invenção pode compreender o fornecimento de uma fonte de zinco ao cão. Como descrito aqui, o zinco

pode ser fornecido em qualquer forma apropriada ao cão. Os gêneros alimentícios que contêm o baixo nível de cobre da invenção podem ainda compreender o zinco, por exemplo, em uma concentração de pelo menos 120 mg/kg de matéria seca. Alternativamente, o zinco pode ser fornecido sob a forma de um ou mais gêneros alimentícios ou suplementos separados. O uso dos gêneros alimentícios da invenção pode compreender o fornecimento de um suplemento de zinco ao cão. Um suplemento de zinco poderia ser fornecido em qualquer momento, isto é, separadamente, simultaneamente ou sequencialmente aos gêneros alimentícios da invenção. O suplemento de zinco poderia, por exemplo, ser misturado com os gêneros alimentícios da invenção antes de ser fornecido ao cão, ou poderia ser posto na água de beber do cão.

Os gêneros alimentícios da invenção podem ser fornecidos ao cão uma ou mais vezes por dia. Os gêneros alimentícios são preferivelmente fornecidos no lugar do alimento convencional do cão. O método para prevenir o acúmulo de cobre ou para prevenir a hepatite crônica pode ser usado por um período de tempo indefinido, isto é, por toda a vida do cão.

A invenção é ilustrada pelos seguintes Exemplos:

Exemplo 1

Elucidação de SNPs associados com a suscetibilidade ao acúmulo de cobre

120 amostras de DNA de Labrador foram genotipadas através de mais de 22000 SNPs. Havia 72 amostras de cão a partir de cães com cobre elevado (níveis no fígado de cobre acima de 600 mg/kg) e 48 amostras de cão de níveis de cobre no fígado normais (abaixo de 400 mg/kg). Os dados foram analisados usando comparação por pares entre cada par de cães possível. Os dados foram requisitados de acordo com o suporte de um locus informativo de doença. Os dados a partir das melhores três posições genômicas foram usados usando operadores Booleanos para encontrar os melhores marcadores de ligação ligados aos níveis de cobre elevados. Os resultados de um modelo Booleano simples usando as três posições são dados abaixo:

Tabela I Resultados do modelo Booleano simples usando as locações genômicas CFA8,CFA32 e CFAX

CFA8 (região do gene GOLGA5)	CFA32 (região do gene UBL5)	CFAX (região do gene ATP7a)	% de cães com esse padrão de alelos que têm alto cobre	
1	x	X	69,0%	
1	1	x	72,3%	
1	1	1	81,5%	Dos 27 cães com todos os três alelos, 22 (81,5%) tiveram alto cobre
1	1	0	60,0%	
1	0	x	64,9%	
1	0	1	77,8%	
1	0	0	60,7%	
0	x	x	36,1%	
0	1	x	55,6%	
0	1	1	42,9%	
0	1	0	63,6%	
0	0	x	16,7%	
0	0	1	50,0%	
0	0	0	7,1%	Dos 14 cães com nenhum dos três alelos, 1 teve alto cobre

A chave aos valores binários na Tabela I é como segue:

Posição genômica CFA8 (gene GOLGA5)

1 = se há um genótipo AA em SNP BICF2P506595

0 = se há qualquer outro genótipo em SNP BICF2P506595

Posição genômica CFA32 (região do gene UBL5)

1 = se há um GG em BICF2P772765, um CC em BICF2S2333187 e um GG em BICF2P1324008

0 = se algum daqueles SNPs mostra um genótipo diferente

Posição genômica CFAX (região do gene ATP7a)

1 = se há um AA ou um AG em BICF2P591872

0 = se há um GG em BICF2P591872

Em todas as posições, X = alelos não utilizados.

A Tabela I representa as condições binárias dos alelos em três posições genômicas. Na posição genômica CFA8, um SNP foi usado (SNP 1). Na posição genômica CFA32 os três SNPs foram usados (SNPs 2, 3 e 4). Na posição genômica CFAX um SNP foi usado (SNP 5). Os valores binários são indicativos de um cão que tem alelos que são indicativos da suscetibilidade ao acúmulo de cobre (alelos "ruins"). Por exemplo, 000 representa não ter nenhum dos três alelos ruins. 111 representa ter todos os três alelos ruins. Os Xs são os alelos não utilizados nesse gene. As linhas 1xx e 0xx mostram o poder que um teste genético usando somente o SNP no gene GOLGA5 teria.

A Tabela II mostra que os cães com mais dos alelos indicativos têm uma alta concentração de cobre em média. Nós podemos também ver o número de cães com cada padrão:

Tabela II

Gene Combinação	**Quantidade media de Cu_2 (mg/kg)**	**% de cães com esse padrão de alelos que têm cobre elevado**	**Número de cães com padrão**
111	1253,09	81,5%	27
110	733,40	60,0%	20
101	1138,90	77,8%	9
100	737,84	60,7%	28
011	502,27	42,9%	7
010	670,83	63,6%	11
001	450,00	50,0%	4
000	332,47	7,1%	14

Tabela III Posição e sequência de SNPs usados para os resultados na Tabela I e II

SNP	SEQ ID NO:	Cromossomo em canfam 2	Localização em canfam 2	Gene contendo próximo da mutação	SNP Sequência SNP = [base do tipo selvagem/base alternativa]
BICF2P506595 (SNP 1)	1	8	4886813	GOLGA5	CTCAGAACTAGATAGGCTAATAAGTGATAGGCCTTGTGTTTTCCTAGAGTGTGCTTTA A- A[A/G]GTTTCTTAAGCTAAAAAATTACATTCGTGAGAAAATTGAAATAAAAGGAAAA CAGTCATG
BICF2P772765 (SNP 2)	2	32	39278300	UBL5	TCTCAGATACTTGATAGCCAGCATTTCCCCCCATTTTCTTCCAAGAGCACGAAAGCAT AG[A/G]AATGATATTACATCTCGTATGGTGAATGTGACACAGCCGTCAGTTGCGTTA GCTCTGCTT
BICF2S2333187 (SNP 3)	3	32	39390236	UBL5	TATTACCCTGCTCTCCAGCCACTCCTTTACCTTCCATTAGCCCACACCTGCTCTACAC AC[T/C]ATTGCTCATGGAAGCCTTGCCACGTCCAGTCGCCACTCTGAAATGCCAGCA TCCCTCCCA
BICF2P1324008 (SNP 4)	4	32	40043909	UBL5	GACCTGACAGATTATGTAGACTTTGTTTTCAAAGGGAGCACCTGCTGGATATACAACA TG[A/G]CACTAAATTGTGCTCCACATCCTTGGCAGAGGTGGGGGGCGGGGCACAAAG GAAGAAACC
BICF2P591872 (SNP 5)	5	X	62989720	ATP7a	GGGCCCAGCAAGTGGCAGAACTGCGAAGACCCCCTCTTCTTCCGCCTGGAGCAGTGGT GT[A/G]GCAGCACACCACAGGAGTCTGAAAGGGTGGGGAGTCCAAACGGGAACATAT ACCTGAGAT

Tabela IV Posição e sequência de SNPs adicionais indicativos da suscetibilidade ao acúmulo de cobre no fígado

SNP	SEQ ID NO:	Cromossomo em canfam 2	Localização em canfam 2	Frequência de Alelo	Frequência de Alelo Menor	SNP Sequência SNP = [base do tipo selvagem/base alternativa]
BICF2P1246154	5	X	47335181	0.999507	0,000493	GGCAACAGGGACAGGCTGCTGGGCCACACACTCACCCACACTAGGAGACAAGATCCTCCA[T/C]ATCCTGGGTCTCTATCAGTCAATCACCTAGACCAGTGGGCCAGAGGACAGGGTCCAGCTG
BICF2P463335	6	X	44401786	0.000493	0,000493	GTTGAGAGAGATCATACAGATTCATGTGGCAGGTGCACACTTTTTCTACCTCTTACAACG[T/C]ATTCTCTCTGGCCATTCCTTCTCCTGGGTCCCAAAGTCGGAGAGCTTAGCGGGAGCCTAG
BICF2P1246989	7	8	4149835	0.999506	0,000494	ataagttcacattttgGTGTTTCAAGTGGACATGAATGGAGGGGAGGGCCCTGTTCAATC[T/C]ACTAAAGTGTTTTTTCATCTTGTTTTTGTGGAAATCAAATCAAGAAGCAGAGTTTTATGT
BICF2P723557	8	8	3406227	0.999014	0,000986	ACTCTCCCGATGTGGGCACCATATGGTGGACCACTTTCTGTGTGAGATGCCTGCTCTTAT[T/C]GCCATGTCCTGTGAAGACACCATGCTGGTGGAAGCATTTGCCTTTGCCCTGGGTGTTGCC
BICF2S23427298	9	8	5393517	0.999014	0,000986	AATCTAAGTAGACTGAGTGGTCACCTTCAGCGCTCAGACCTGAGCATACAAAGCATGGAA[A/G]GTTACTGTGATTCAGCTGATGTAATGGAATGAAATAAATATAAGAGTTTGGTAACCTAAT
BICF2P312189	10	8	5773958	0.999014	0,000986	TGGAGAGTGCTGGCAGGCAGGGGCAGGCAAACAACAATAGCAAAGATCTCTTCCACGCTT[T/C]TACTTCCTCAAAAGTCCAAGCCCTCTTAAGATCGCATTTTCTTAGTGACCTTCACTCTAA
BICF2S24321583	11	X	56410647	0.999014	0,000986	TTCTTTGCTAGGCCAAGGGCAGAGAATGCATGCCCCCCCTTACCTCCCAGGGCCCAAGAG[C/G]CATCCTGAGCTGAGTCTATGGCTCCTGGTGGGGGGCGGCTGTGGGTTGGGGGGGCACAGA

Tabela IV -continuação-

SNP	SEQ ID NO:	Cromossomo em canfam 2	Localização em canfam 2	Frequência de Alelo	Frequência de Alelo Menor	SNP Sequência SNP = [base do tipo selvagem/base alternativa]
BICF2P1273450	12	8	3160594	0.999013	0,000987	ggtgtcaccaatgccagcgagcaccagctggagggaacaggacacaggtcctccgtcCTG[T/C]GACACTCGGATCTGGGGCTTTGCCTCCAAAACGGAGACCATGCCTGTCCATGGTTCTACG
BICF2P1439540	13	8	3771142	0.998521	0,001479	CTCTAGAACCCTTCAGGTAGACTACATTCACTTTCTACTACAACTTCATCACCACAACCA[A/T]CTCCCAGTAACCCCCttttttttcttctccttttttttatttttttccttcttttttgctcgtc
BICF2P506204	14	8	4191144	0.998521	0,001479	TCCCATGGGTTGAAGGATATCTGGCAGACGGCTCCAACTCCAGTAAAGCCTCAGGCCTCA[A/G]CCAGGAGTTCCCCGGGGCTTCATTCCCATCCCAGACTTTGCCCAGGGCTGATTTGAAAGT
BICF2P380732	15	8	3299879	0.998519	0,001481	TCTTCCTTGCAGATTGGATGGCTGTAGCCTCACCTCACACTGTTGCTGGGATCTGTCCAC[A/G]CTTCTGACCTCCAGCAAGAGCCTCCGGGAGCTAAGCCTGGGCAGCAATGACCTGGGAGAT
BICF2G63016020	16	X	73980557	0.004955	0,004955	TATTGCTAGTAAAGCCAAACTTTCTATTCCACAATTATAAACTCATGGAGATGGTAATTA[T/C]AGTGCATTATTTGTCAAATTTTATTATTTTTTCAAATCCCAAAGAAAATGTGATATTCTA
BICF2S23623569	17	32	38362784	0.994576	0,005424	AAGAACAAGGATACAATCTAAGTGATAATCATCCAGCATGTACTTGTCCTGTTTTCAGAT[T/G]ATCAGCTTAAGTCAAGAGGAATTTTTAGTGCTTACAAATATTTCAAGTGATTTTTCCAGA
BICF2P216837	18	8	7474389	0.012327	0,012327	TGAAGGGGTGCTACTCAGGGCTCTTCATTTAACCTTCCAGGATGTTTTCCTATGTACTCA[T/C]TCTTCCTTTTGGTTGCTCCTTCTTCTTGCATTTCTTTATCTCTTTACAGAATCATCCAGG

Tabela IV -continuação-

SNP	SEQ ID NO:	Cromossomo em canfam 2	Localização em canfam 2	Frequência de Alelo	Frequência de Alelo Menor	SNP Sequência SNP = [base do tipo selvagem/base alternativa]
BICF2S22922146	19	X	75388683	0.986193	0,013807	acaaccctaaaatttcagtgattcagtacaacaaaggtttattATAACCATTCAGGGATC[C/G]AAGTTGGTAGAAACTTCACTACAATACCTGCTTCCAGTCAACAAGACAGAAAAAGAAAAA
BICF2G63015714	20	X	74415223	0.01382	0,01382	GCAGGGTTGATATATAACTAGTATGCATTAGGTAGACACCTATTTTGATTACTCACTATT[T/G]TAATATCAGCCTGGTAGTAAGAACCAAATCTATTATGTAAAGTGCATAGAGAATTGaaag
BICF2G63015674	21	X	74439123	0.0143	0,0143	CTAGCTAGCCACCCAACTCCCCACATGCCCAGAGTCATCGTTTATCTTTTCACATCAGCA[T/C]TACATTTTGGCTTGCATTCAAACATTAGCCCATTTTTTTTCCTTTTGTTTTATTTATAGA
BICF2P426463	22	8	5833993	0.015286	0,015286	TTTTCTCTTTTTCCACAAATGCTCTGGGCTTATTTTCATTATCTAGTATTTCTCTTCTGA[A/G]GCTAACTCCCAAAGAGTTTTGTGCATCCTTATTTCCATCACAAGGTCAATGTACGAGTTA
BICF2S22926688	23	8	7502279	0.015779	0,015779	GGGCCCAAGGGCTGAGGATCTCTGTACCTTCTGCTTCTTGGCAGCCCAGGCTGGGTAGCA[T/G]TTCTTGGAACAGGATTTCCCATGAGTTGTTAACAGAAGGGCGGGCTTCCAGGCGCTGCTT
BICF2P1113947	24	32	38074100	0.981169	0,018831	CATCTTTGCTTGGGGCCTGGGGTTTTTATTGAGGATTGTGATCTGGTGTATGTGTCTCCT[T/C]AGGCATCCAGAAACCATTCAGAACAAGAACAAGCGTCCAGGTATCCTCTGTAAGTCACTT
BICF2P342874	25	X	44861101	0.020217	0,020217	ACAAACCCTCAGACCCAGATACACAGTATCATGTGGACACAGACATGTAACACCAAAATG[A/C]CCAACATCATGTGACTACAGGCCCTAAGCAACTAGGTGTAACATCACTTGGGTATGGGCC

Tabela IV -continuação-

SNP	SEQ ID NO:	Cromossomo em canfam 2	Localização em canfam 2	Frequência de Alelo	Frequência de Alelo Menor	SNP Sequência SNP = [base do tipo selvagem/base alternativa]
BICF2P1171925	26	32	36457625	0.022189	0,022189	AATGCAGTAATACATGTAGCTAAACCTAACCATCAGAGTCTGTTCTATCCTTCTACAAA A[A/G]TAGGGTTGGAGCTGAGCACATAGGTAGCATACATCTAGCAAAAGTTTTTGCCT TCAgatt
BICF2G63017200	27	X	71984532	0.025641	0,025641	ttgtggggtcaggtgagttatggacccctccctactcttctgctatcttgccccCTACA G[T/G]GGTTGCTATTTTGATGTAATCACAAAACGACCTGGCAATAAAACCTTTTTCTA ATTAggg
BICF2P1286548	28	X	57448138	0.026423	0,026423	GATGCAAGCTGGGACAGAATAAGGTACTGGGCTGTGTCAAGCCCCAGTAAGAGAGGAGC A[T/C]TGTAGGGTAGTTAGGATGGACTTAATGGAGATGAGTCCTAGGGAGCCACACTC AGAGTTA
BICF2P790089	29	32	38885957	0.0286	0,0286	TAAACACCCCCAATCACTACCATCCTCACACCTAAGGATACACAATGTGTCTACTTTAT G[A/G]TATGTCTTTACTATTCGTTGCTTATGAAATTTTATTCATTAWCTAAAACAGGG AAAAAAG
BICF2G63016713	30	X	72619011	0.9714	0,0286	TATAGYTGGSCAATTAAATCTCCTATTCTTTTGTCTCAAAGGATATTTGAAATTACATA G[T/C]TCTTTTCTCATATAAAACCTACCATACAATCATTAGATGATCCTTCTTAGTTA ATTTTTT
BICF2P276536	31	8	3149437	0.966436	0,033564	GATGCTGTGGGCCAGTCCAGAACCCACCTGAGAGAAACAAACAGGCCTCTTTGCCAGCA G[A/G]GCAGCGTCAGTGTCACCCCTGTGACATGTCAGAACCTCCCTGAAAGTTCATCT AACCTCT
BICF2G63015658	32	X	74531965	0.963018	0,036982	GGCTCAGAAGAAAAATCAGCCCAGTTCACATCCAATGTTTCCACACATCTAATCGTCTT G[A/G]GTTCAGAGGTAGATGTGGTATCACTTAYATGGACACATATAACAGCTGGCCCC CACCTCT

Tabela IV -continuação-

SNP	SEQ ID NO:	Cromossomo em canfam 2	Localização em canfam 2	Frequência de Alelo	Frequência de Alelo Menor	SNP Sequência SNP = [base do tipo selvagem/base alternativa]
BICF2P308749	33	8	7325380	0.962032	0,037968	gtttcagttaattatagtccttactggatccgattgctgtggcgctaaaatgaAAGAAG G[T/C]Agggtacctgggtggctcaggggttgagaatctgcttttgactcaggtcatga tcccagg
BICF2P872820	34	8	6388554	0.956114	0,043886	CAGAGTAGCATTATTTTCTGCTGTATGAGGACACTTTTGTTATATCCACAGTGGACAGA A[A/G]ACTGGGTTTTAGAACATGCTCAATTGAAACAAGACTGAGGGCTCACAAATTCC TGCTCCA
BICF2G63016210	35	X	73592920	0.955084	0,044916	TTACTTATTCATCTGAGACCAAGGCCACTGTGGTGAACCTACAAAGCCTTACAAAGCAG G[A/G]CCAGAAGGGCACATAAATCACTTGACTAACATTTGGTCAAAATAGCTCTTGGG CTCTTTT
BICF2G63016209	36	X	73593955	0.049456	0,049456	ATAAAAATAAAAGAGCTATTAATAAGAACTCATAAAATCTACATAAATATAGTAACAGG T[T/C]AATATTCCCAGCATATTTTTACAAATCATCTATAAAGAGCATGAGAGCATATA GGGATTA
BICF2P1149405	37	32	41212550	0.941321	0,058679	GCAACAACCTGGTTTGTGTGTGGGAAGCTAATGCCTCCCCAAATGCAGCAAACTCTCCT C[T/C]TGATTTTAGAAAAGCAGTTTAGTTACAGGCAAATGCATACATGCATGATAAAT ACTACTC
BICF2G63016173	38	X	73672050	0.940828	0,059172	GATTTTATAAAACATGATGACCTTGGCATTTATATAGTAGATATTACTACTCTGAAATT C[C/G]AGGAAGTATGATCATAAACTCACACTTAATCTGGTAGAAGTATGGACAATGTA TCAAAGG
BICF2P401962	39	8	4495597	0.935897	0,064103	CTTGGTTGAGTTAAAACATTTGCCCATGCAATTTAATGCATGTCCCTGTGGGGTTGGAA C[T/C]GACGTACACCCGAGCCAACAGCCTTTCATGGCAGACGCCATCAGGCAGGTGAC CCCCACC

Tabela IV -continuação-

SNP	SEQ ID NO:	Cromossomo em canfam 2	Localização em canfam 2	Frequência de Alelo	Frequência de Alelo Menor	SNP Sequência SNP = [base do tipo selvagem/base alternativa]
BICF2P991264	40	8	3165755	0.071992	0,071992	CCTTCCACACGCTCAGGTTGGCACGGAGGGGGTGTCCTTGCCTGAGGGGTCCTGGCACAG[T/C]CATCAGGGCACACAGCTGATAACCCAAGGGAGCAGTAGGCAAGACCTCATGGGCGCCGGG
BICF2S23230847	41	X	58531292	0.079389	0,079389	ATTCTCTTTGCTGTCTCCTGTATACAGAGATAAAAGCAAGAGTTTTCCCCTTCAGGTTTC[T/C]GAAACCCAGCTTCCTTTAGATTTTAAGGGGTATTCTGTGTACCCATTTCCCACCTTCTGC
BICF2P1252842	42	8	4618608	0.919132	0,080868	GCGGGTTGGGACCCCCCCTTCTGCTGCTCCCACTTCAGAGTTGTGGCGTCACTAAGATGA[C/G]ACCTCATGTCGGGAACCTGAGAGTCCCTCGGGAGTTGTGcagggactgtagccgacctat
BICF2G63017198	43	X	71984983	0.913947	0,086053	ACATATGCACAGTGAATCGTGGATTGTTGTGTTTGATTTCTTACATGATACAATAAAAGG[A/G]AAGTAGTTGAAGCAAAACTTTAGTTTAAAGGAAACAATTTCTCTATCATAATGTTCAGTG
BICF2P1364202	44	8	3175135	0.910256	0,089744	CCCACAGACCCCAGGTGCTGACCACAGCAGCCACTTGGGCCCCCAATGCAGGAGACACCT[T/C]GGGAATGAAGGGGACAAGGCCAGCTCAGGCACATCGTCAGTGCACCTGATGGGAAGGCCG
BICF2P963708	45	8	5472668	0.095945	0,095945	ATCTGATCCTAGCCAATGGAAAGCAATTTGAGATAGGAATCATATCTTGTTTTGGTTTAT[A/G]TGCTTTCTTTTGGAGTTTTGCACATCATAGATAACTGTAAATTTGTAGAATAAATGTTTGA
BICF2S22939481	46	8	7696228	0.098619	0,098619	GTCAATGCCATTAACCTGGCGAAGCTGCTCGAGCATCCACTGCGATCTCCGCACGAACGA[T/C]GTGGAGCCTTCAAACTGTTTGACCTTCGTGATGGATGCTTGTGTGGGTTTCTTGTTTGTC

Tabela IV -continuação-

SNP	SEQ ID NO:	Cromossomo em canfam 2	Localização em canfam 2	Frequência de Alelo	Frequência de Alelo Menor	SNP Sequência SNP = [base do tipo selvagem/base alternativa]
BICF2P1028186	47	32	40758922	0.107495	0,107495	ACTGGTTAATAAGACTTCACAGATTTTATCCATCATGTTGATTATCTGTATATGTATTTT[T/C]TACCACTTAGGATAAAGTTCTGTTATCTGTAATTGATTCCAACCAGCATGTTTGCTCCAA
BICF2P19238	48	32	40849057	0.892012	0,107988	CTTCTTCTTTCCCATTGGATTCTTTCATCAATCGTAGGTAGTTCTTAATGAAGATCTGTG[A/G]TAAAGCCATTCATCTATTCATTCAACAAATGGCATCACAGAAAAGAAAAATAACCTTTAT
BICF2P247312	49	8	7825200	0.112426	0,112426	GGGACACATTTCTGGACAGACCTCTGATCACACTCACAGGACAGCAAGAGGAAGCTCTGG[A/G]TACAAGTACAGGGAAAAAAGAAAGAAATGGTCACAGGGAAGCTGCCGCAGGAAAAAGGTA
BICF2S23017118	50	8	7615543	0.881164	0,118836	GGGCAGATCCTCAGTGAGTATTGGCTCATGTTCTCCGAGGGAAGTAGAGTCCCAGAAGAA[A/G]GATGCTAAGGTGCCAAGATTCCTGAGCCTGTGTGTGGTACAGTCACAGCAGTACTCCTGA
BICF2P132419	51	32	35699747	0.874506	0,125494	TCATCTCCATTTGTAATAGAAACCACATATATAGAGAGATTGGATTATTAACCACTAAAA[T/C]GTAGCCACTCAAGGGGAGGGGGGGAATGCATTTGGTTTATTTCCCATGTCAAAACAGAAT
BICF2S23115911	52	32	40712955	0.873393	0,126607	AACACTGCTAATAAATATTTATAATGGTTTGAGGAAAATATCAGGTGTGAGATGTCTTCA[T/C]ATCATATAATATATCATAATATCCTCTAAAAAAGCTCTAAGCATAGGTCTATGGAACTCA
BICF2G630531773	53	X	43502595	0.127219	0,127219	AAGCAATCCAGGAGTCTTTCTCCGGGTAGCAGGCTCGCTTTACAGGTTAAGGCTGGATGA[A/G]AAGGAAGAACCTGAGCTTCAAATTATCATCTGAGTAGAGCTGATACCCATGGTTACATTA

Tabela IV -continuação-

SNP	SEQ ID NO:	Cromossomo em canfam 2	Localização em canfam 2	Frequência de Alelo	Frequência de Alelo Menor	SNP Sequência SNP = [base do tipo selvagem/base alternativa]
BICF2G630587826	54	32	38771348	0.127838	0,127838	GATTTTATTCTTTACTTTGATTTTTTTTAAGTTTTACTATGATATTCAATATGATTGTG G[T/C]TCATGAGATTCCTCTTTTTAGCTGTATCATTAACTACAGAGCGTTCTCAAATA TTTTTCT
BICF2P1007047	55	8	4812890	0.87092	0,12908	GTGGCCGGAGGGGGTGGGCCCTACTGTGGCCCAGCTTCACGTCCCACTGGCCAAACATC A[A/G]GATGCAGACACCCAGGTCCCTTGTGCTGCCTGCTGAGGCTAGGAGCAGCGACT GGAAATG
BICF2G630531804	56	X	43317321	0.869329	0,130671	GATGGGAGACCTCATACACATGCAAAGATCACTATTAAAGACTCTCGAGCAAAGATCGA A[T/C]GGACTGTGGCAAGCTGCCGCGCATGCCAATCAACAAATGCCTCCGACCATGGA TCTAACC
BICF2S23632876	57	8	5656863	0.866371	0,133629	CAACAAGGTTTTTAAGGTTCTTTTCACTACCTTCTTCTTTTTGTACTTGCTTAGGACAC C[T/C]GTATGTCTTCACAATATCACCTGAAAGTCCTTTAGGAGATATACTCAAAAAAT AAATAAA
BICF2G63015587	58	X	75321307	0.865385	0,134615	caacctgagctgaaggcagacactcaactgttgagctacccaggtgtaccAAACACATC T[A/G]CTCTTAACCAAGCTTATTCTTTGCTATATTTGGCAAATTGTGGCATGTCTACA GTACTCA
BICF2P482693	59	X	43587959	0.864892	0,135108	ATTCCCCATGTTTGAGGAAATCACAGGAGCCACTAGGAAATCAACCATTTCCCAACCAA C[T/C]TGATGATTTCCTGATCCAAAGGTTCTCCCAGGACAAATATGAGGTAGCCTTTC ACACTCT
BICF2P940430	60	32	40921126	0.136364	0,136364	CAGTCTTGTAGGAGAGTAGATTGACTCACAGAACTGGCAAGATTGGGAATCTGAGCATT G[T/C]CACTTGAGTCTTAAAACGTTTACGATTTTATTTCTAGTATTTCAATAAGAAAC ACATTCT

Tabela IV -continuação-

SNP	SEQ ID NO:	Cromossomo em canfam 2	Localização em canfam 2	Frequência de Alelo	Frequência de Alelo Menor	SNP Sequência SNP = [base do tipo selvagem/base alternativa]
BICF2P786384	61	32	36389913	0.136723	0,136723	GAATACATTGCCAGAATAATTTCAAGTTCTCAAATCTCAACTAATAAGATTTTCGTTAAA[T/G]AAGGCATTCAATCATCACTTACTGACAACCCACAAAATTAGGCACTGATGAAAAATTAGC
BICF2P1340243	62	32	41050914	0.150394	0,150394	AAGTTAAGATATTCAAGAAAGAGAAGAGAGTGACTGAGCTAAAAAGAAAATCAGATCTCT[T/C]CCAGGCTTTAAAATAATCTCCACAATACTGGGCAATCCATGTAGTCTCCCCAGTTCCATT
BICF2S23626445	63	32	36617978	0.153846	0,153846	CTCAAAAGGAAAAGCCTGTGGAAAGGCAAAGAGGTATGTGAAAGAGGTAAGTTCAAAATG[C/G]TGACATGACCAGTGTACATAGATTACAGGGTACTTGGAGGAGCAGTGAGAAAGGAGTCCA
BICF2P161586	64	32	37795702	0.156312	0,156312	TTCTATGAAATAGCTACCATTCTGGTTGGTATCTTCTGTTGATTTAGATGATGAAGGAAG[T/C]ATAAGAAGTAAGGCTTATGAGTTTATAAAGCTTTAGTTAAAGCTTTGATTGTGACAAAGC
BICF2P579617	65	32	36631235	0.162389	0,162389	AGAGGAGAAAACACAGCTAAAAACTTTTTTACAGACTGGACAAAGGTGCTTACACTTTTC[A/G]TATTgggcagaatgaggggatgaaaacaccagtggtctttttgaagccacacaaattcag
BICF2G63016280	66	X	73386098	0.835968	0,164032	AGGATGAATATTTATTAACAGTAAATATACATTTTTATTGTTCTATATACTCTAAAGACA[A/G]TTGTAGACAGTAAGATATATCAATTTTAGAAACAGAAATAATGTTAATTGTATAATATGG
BICF2P721687	67	32	40771787	0.829389	0,170611	CAGGGATTCCTAAAGGGTGACATGGTATGGTCTAACACTTCCTCACTGTCCTTTTCCCAG[A/C]TGATATAAGAGGAGGACCAGAGAGACACATAAACTGTCTGAGTCTTTAGCATTGTGATAA

Tabela IV -continuação-

SNP	SEQ ID NO:	Cromossomo em canfam 2	Localização em canfam 2	Frequência de Alelo	Frequência de Alelo Menor	SNP Sequência SNP = [base do tipo selvagem/base alternativa]
BICF2P504739	68	32	37328946	0.827909	0,172091	ACACTAATGGGTAGAGAATACACGTCCATCAGTCATCAATGTAATCTACTAACAGCCTCA[C/G]AGTCTGGCAGTTTTCAGTGAAAAGAGGAGTCATCTCCATTTATTCGAtcaatcagttgac
BICF2S23331874	69	32	39390236	0.825444	0,174556	TATTACCCTGCTCTCCAGCCACTCCTTTACCTTCCATTAGCCCACACCTGCTCTACACAC[T/C]ATTGCTCATGGAAGCCTTGCCACGTCCAGTCGCCACTCTGAAATGCCAGCATCCCTCCCA
BICF2P772765	70	32	39278300	0.816075	0,183925	TCTCAGATACTTGATAGCCAGCATTTCCCCCCATTTTCTTCCAAGAGCACGAAAGCATAG[A/G]AATGATATTACATCTCGTATGGTGAATGTGACACAGCCGTCAGTTGCGTTAGCTCTGCTT
BICF2S2318354	71	32	35849858	0.18787	0,18787	ACAGGAAGGAGAACTGAGCATCAAGAGAGTTCAGAACATGATCATTGGGTCAGTTTGTGG[C/G]TGCATTAACTTTTCCCCAAAACAGAAAGCAACAGAGACTTCTGTAGGTCAGTCAACAGTG
BICF2G630588054	72	32	38521693	0.810052	0,189948	TTACCATTACTATAACCCAAGTTATAGTATACTATAACCAAGTCCTTAATTGACTTGATG[T/C]TTGTGCAGCTGATTTTAAATCTATTTAGAATAATAGTTTACTTGTGACAATTCATATTAA
BICF2S23313445	73	8	6343006	0.809665	0,190335	TTGGTCGACTGACTGATTGGTTTTACTGTGGAGGAAAGAAAAGGGAATTTTCCCAAAGAG[A/G]ACAGAGAGAAAACATGGAATTGAGCAAAGGGAGAATAGAGAGACAGGGCAGCCACTGAAG
BICF2P675334	74	8	4477476	0.19428	0,19428	TGCCTTATCCTCCAGCTCCTCCCTCACCATCTTGGAAACTAGCTCAAATGTCACTGGTAC[T/G]TGTCTTTCTTTTGATCTTTCTGAAAGACAAACATGATCCCATCACCTCTGCCTTTAGAAC

Tabela IV -continuação-

SNP	SEQ ID NO:	Cromossomo em canfam 2	Localização em canfam 2	Frequência de Alelo	Frequência de Alelo Menor	SNP Sequência SNP = [base do tipo selvagem/base alternativa]
BICF2G63017409	75	X	71722644	0.804241	0,195759	ACTCCTAAGTAAAAGTTAAATTAACAGATTTGCCATCAAGTACCTTGCCCATTTTTCCTA[T/C]AGATCGACTTTTTACTGGATGATCCCCTTGATAATAATCTTGATCTATGTTTTAATTCCA
BICF2P798346	76	8	4651519	0.195759	0,195759	ctggtgggcttgtcaggggcaggatgttgtgtggtgagcacagaattaaaactaggaGCT[T/C]gaagcgcctgggggggctcagttggttgacggactgccttcatctcaggtcatgatccctg
BICF2P1150684	77	8	7652070	0.802761	0,197239	CATACAGCGAAGAGATAAAAACACAGGATGCTGGGCTCACGACCATGACCGGAAAAGGAC[A/G]GCGAGGAAAAGCAAGTATGAGCAGCCCAAAGTCCTTTTTCCAGCACTGGCCATAGGAGGA
BICF2P1348758	78	32	36083895	0.801579	0,198421	CAGAGATGAGGAATCAGACTCCTCGTCCTCTGCTTCTCTACAATGGCTCATGTTCTCCTT[T/C]CCCCTCAGCTGTTGCATTAACAGAGGTCAACCCATTCTTCTAAATTTAAATCTCCCAGAA
BICF2G63017599	79	X	71555277	0.198617	0,198617	AATCAAACAAGTGCTAGAACATAGAACAAGTGGCTCATCTTTTCCCCAAATGTCTGGATA[A/G]GAAAAAAAAAATCTAAACAAATGCTAGATGTTAAGTATCTGAAATGATCAGCCCATGAAA
BICF2G63016090	80	X	73800072	0.200197	0,200197	TCCATACCAGTCCTTGTTGTCTACCCCGAACTTCACCTCTCTAGGCACAGACAGCTCTAA[A/C]TTTCACTCATAGGTATCTTATGCTGACCTGGCCTGCCTCCtgttttgttttgttttgttt
BICF2S23524027	81	X	64785623	0.79931	0,20069	CAAAAAATTCCCTGAGCCCAGCATCAAGGTACCTGGTTTGGAGTGGGTGGGTCCTCAGAA[A/C]GAATGGGTGTGGTGTACATTTAGCAAGTTATGTAGCATGTGTCTGTGTAGTCTCACCTCT

Tabela IV -continuação-

SNP	SEQ ID NO:	Cromossomo em canfam 2	Localização em canfam 2	Frequência de Alelo	Frequência de Alelo Menor	SNP Sequência SNP = [base do tipo selvagem/base alternativa]
BICF2P591872	82	X	62989720	0.795252	0,204748	GGGCCCAGCAAGTGGCAGAACTGGGAAGACCCCCTCTTCTTCCGCCTGGAGCAGTGGTGT[A/G]GCAGCACACCACAGGAGTCTGAAAGGGTGGGGAGTCCAAACGGGAACATATACCTGAGAT
BICF2G630587712	83	32	38968302	0.794379	0,205621	atataatataacttatttaaaatatttGAAGATATTTCTATAGTTATGCTCTACCATTTG[T/C]TATTATAAGATTTCCAACAGCTTACTTCTTGTATGAAATTAATTTACCAGCCCCTCACCT
BICF2G630587722	84	32	38964413	0.792899	0,207101	CCCTATTCTATAAACATTCCCTCTCTGGCCATCCTGTCAAGTGGGCCCTGACAGTGTGCC[C/G]CAGAAGCTCCCTAGCCTTTGCCCATTCCAGCTATGGCTAGCCTGCCACCAGCCATACACA
BICF2G63018557	85	X	66396513	0.218164	0,218164	CACTGTGAGGTCTGAATGGAGACATTCATGATAGACTCCAGGATTTTCCCAGCTATTAAG[T/C]CATGGGCCATAAACTGGAACACTTGGAAACAGTCCATAGGTTCATATTAAAGAATATGTT
BICF2P652606	86	32	37855796	0.776134	0,223866	GCAAAAGGAACATGAGTTCTGATCTTCTGTAAAGGAGGCTAATTTACTAATGGTCATAAC[T/C]GTGGcctgagggtcaagtttctaattaaacgtgcatcttggggYggactagaatactttc
BICF2S23312799	87	32	36791310	0.224852	0,224852	CAAGGSCCAGGTACCCTGAAGGAGTCCGCTTCACCCAGGCATGATGTGTTTGACAGTCTT[T/C]GTAATTGATACAGCCATTGGCATCCTCTTGCGGCCAAYATCAGCTCCACTTCAACCTCGG
BICF2S2303948	88	8	5896281	0.773669	0,226331	TGCAATGGGTTTTGAAATTAGAGGACATCACAGCAGAGTAGAATGGTTTGGAACAGGGGA[A/G]TATGATTAGGATTAATGAGATGAAAGAAAATTCTGGCTAGAGGGCTAGAAGAGCCATGGA

Tabela IV -continuação-

SNP	SEQ ID NO:	Cromossomo em canfam 2	Localização em canfam 2	Frequência de Alelo	Frequência de Alelo Menor	SNP Sequência SNP = [base do tipo selvagem/base alternativa]
BICF2P506595	89	8	4886813	0.228304	0,228304	CTCAGAACTAGATAGGCTAATAAGTGATAGGCCTTGTGTTTTCCTAGAGTGTGCTTTAAA[A/G]GTTTCTTAAGCTAAAAAATTACATTCGTGAGAAAATTGAAATAAAAGGAAAACAGTCATG
BICF2S23130600	90	8	5180802	0.228304	0,228304	GATACTTTGGGCTCTGGGTGGGAGCCAGCAGTGGTGGGGCAGGGCAGGAGTCCAGCAAGG[T/C]GTCTGGGCATACATGTCTGAGAGTAGGAAAACCACACCATTGCACCTTGCCTTTGACTTC
BICF2P1270451	91	8	5580117	0.229783	0,229783	TCAAGGATCAGAAAAATAAAAGCAAAGAAAGAGGCAAAGAAAGAAGAAATGAAATACCTA[A/G]TGGCAGAAGTAGGCAGAGAAATAAAGGCTAAAAGAAAATGGCAGAGGATTGTTTGAAAGG
BICF2G630588267	92	32	37876000	0.23001	0,23001	TATGTTATACTATTTTAGTATCTTAATAAATATGATTAGCCAAAATAGTTTTATCATCCT[C/G]AAAAGTGCAGCATATATTATTTTCTATTAAATTCAGAATAGGTATAAACTAGAAAGCATT
BICF2S23122074	93	8	4965974	0.76999	0,23001	ACAGCAGTTCTGAGGATGGACTCGCAGAGGCTCCTGACAAGCAGAATGACCAGGCCGAGC[A/G]GAAAGGTCAGTGCTGCCAGTCTAGCCAGAAGTGGGGGAGAGAGGATGTAGGAGCAGTACT
BICF2P555643	94	32	40258722	0.230769	0,230769	ACTGTACTCAAAAAAGTTCTGTTTGCCTAAATGGGATCAGCCTCTAATGGATGCCAGTGA[T/C]GGGAGGCTGTTCATCATCCCTTCGGGATAATTCAGAGCCTAGGCAGAGGCCCAGCGTTCA
BICF2S23259999	95	8	4990277	0.231732	0,231732	TACAGGCCCCAGGAAGGAGCCACCAGATGCCCAGGACTGGGCCCAGGAATGATGGAGGCT[A/G]TACAGCTGGCTGCCTGCACTGGCTGCCGCCCCTGTCATCCAGTGTCACAGAGCAGCACCT

Tabela IV -continuação-

SNP	SEQ ID NO:	Cromossomo em canfam 2	Localização em canfam 2	Frequência de Alelo	Frequência de Alelo Menor	SNP Sequência SNP = [base do tipo selvagem/base alternativa]
BICF2G63016525	96	X	72989415	0.251482	0,251482	AGACATTGCCAAGAAGTATCCACAATGAACAGTTTGAAGGGGATCCAGAAAAGCACAGGG[T/C]CTACTTCCGCTGGATGAGCAGCAGTGAGAACCACAGTCAGGTAGGTCTTAAAGCAAAGTT
BICF2G63019552	97	X	60108249	0.737179	0,262821	GCTTTGAAAACCAACAGGAAATACATCCAGGAAAGCTATACAACTGTGGTGAAAGGAAAG[A/G]AAAATCTGCTCTTAAAAGGTTGTGTGCAGACTCACTTGCCCCAGAAACCAGTGCGAAAAC
BICF2G63017884	98	X	70145192	0.271019	0,271019	GAGATGTGTAAAATCTAATAGAAATGAAACTTGCCAAAACAGACCTCTGTACTCGTCAGC[A/G]TTCTAAGTCCATCTTTCTGTAGCATGTAAGTAGAATAATGTTCTATTAATTTCCTCTATG
BICF2G630587598	99	32	39023585	0.706931	0,293069	GTTCTTTCTATTCTATCACACATACCACCCCCCTGCCCACAGTACCCCTTTCTGCCATGT[T/C]TCAGACTCCTACACAAGAGGTTCTCTCTCCTGGCTTCCAGTTAGACAGGCAGGTAAAGCT
BICF2P285901	100	8	6743491	0.70069	0,29931	TAAAAAAATACAACAGTAGCATTAGAAGACATGCTAAGCGGCTGTATTAGAGAAGGTTAG[T/C]GCTGGCCTGAAGTTTAGAAACCTTCCCTTCTCTTTTTTTTTTTCCTTCCCTTCTCTTTAA
BICF2P811511	101	32	36167454	0.30583	0,30583	TCAAGAGTACTAGAGCATCTATAATCAATGGTAAATTGGGGAACTAGTGAAACAAGTTTA[T/C]AGGACAAATAACATAAATAAGGATTTTTTTTTAAATTTGGAAAATTGTGGAATAATGATA
BICF2P1146265	102	X	63433179	0.693725	0,306275	AGAATTCAATTTTGGGGAGCCAGGAAACCAGATTAGTTTTCCAAAGGGAAGTGCCATTTG[T/C]ATCTATCCCGGTGGGGCTGCCAAGAATTCCCTGGGGTGGGAGACGGCGCTTCTGTGGATT

Tabela IV -continuação-

SNP	SEQ ID NO:	Cromossomo em canfam 2	Localização em canfam 2	Frequência de Alelo	Frequência de Alelo Menor	SNP Sequência SNP = [base do tipo selvagem/base alternativa]
BICF2P243607	103	X	57821508	0.690523	0,309477	CACCAGAGAGCCCCGCAAGATCATACTGCACAAGGGCTCCACTGGCCTGGGCTTCAACA T[T/C]GTAGGAGGAGAGGATGGAGAAGGCATTTTTGTTTCCTTCATCCTGGCAGGAGG CCCAGCT
BICF2P382932	104	X	64010327	0.690335	0,309665	TGGTGATGATTTATCCCCCATGTTCAAGATTTATCCTCCCTGTCTCAAGAAATCATGTC A[T/C]TACAGGCATCCTTAAAGTCACAAGACTGGGAAGTAAATACTGATGAGGTCCAA GACCTGG
BICF2P1061734	105	X	57654632	0.69003	0,30997	AGCATAGTGTACCCACATATAAGGTCACATCTGAGGCCAGGGAGTCGGGGTCTTGAAGA T[T/G]ATGACTGATCATGTGCTTGAGGATGATGATGATCATGTGCTTTTCCTGGCTGT GCAGTTG
BICF2S22937235	106	X	57492668	0.310158	0,310158	gtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtTTAATTCTTTGTGAGAAGCCCCTCATTTTGACCTA A[A/G]TTTGGTAGAGGCCCCAGGGGATCTGAGAGGAGAACAAAAGGATAAACCATTTG CTGTTCA
BICF2S22937489	107	X	73723672	0.687068	0,312932	CCAACTTTCACTAGCATCACAGCCCCTATCAATCTCTGTTCTTTTTTTCTGTCAGTACCA T[A/G]TTTGCTCCTACTACATCYAATCTGTGAGCTCACAGGATGAGGACCAACAGCTG CCCTGAG
BICF2P903726	108	32	40883681	0.329389	0,329389	TGTCTTACCTCTCTCTATTCCCTTGTCCATAGTAGTATTAAATATATCTTCCTGAACAC A[A/G]ATCTGATCCAGTCTCTTTTTGTAATTAAAAGCCTTTGCTAGCTTTGGTGATCA CCTCCAG
BICF2P1324008	109	32	40043909	0.664179	0,335821	GACCTGACAGATTATGTAGACTTTGTTTTCAAAGGGAGCACCTGCTGGATATACAACAT G[A/G]CACTAAATTGTGCTCCACATCCTTGGCAGAGGTGGGGGGCGGGGCACAAAGGA AGAAACC

Tabela IV -continuação-

SNP	SEQ ID NO:	Cromossomo em canfam 2	Localização em canfam 2	Frequência de Alelo	Frequência de Alelo Menor	SNP Sequência SNP = [base do tipo selvagem/base alternativa]
BICF2P320425	110	8	7105593	0.336283	0,336283	CAGAGGAAAAGGAGAAGGTCCCACTTAGGGGACTGGAGAGGAGTGGGGGAACATCACCAG[A/C]GCCTTCCTGAGCCAGGCCCCCTGTGGGGAGAAGCTCTCCCCAGGACTGGGTGCCTTTGAA
BICF2S23210713	111	8	6397309	0.634615	0,365385	tcctccctctccccatcccccattctcatgcaagtgtgctctctctctAAAACACCCCCCC[A/C]CACACACACACACAGACACAACCAAAtttgggtctcaatgtcttgaccaaggaaaaggca
BICF2G63018424	112	X	66756995	0.367793	0,367793	gagaagaaggaggagaaagaggaaaagTATATTTGATGGAATGAAAAACAAGAGTTCAAT[T/C]TCACTCTGGTCTGGGGTGACCACTATTAGTCCTTCAACATCTTCCTTGAAGGAATTTTAA
BICF2G63015897	113	X	74179959	0.631164	0,368836	CTGGAATTCTGTCAGATCAACATTCAGAGCTCCATCAAATCTGAGGGAAGCAGTGATAGA[A/G]GATACAATTTGACCTTTCAGTCTATTCAGGTTCATGTAGGTTAGGCATTCAATATCAAAG
BICF2P305287	114	8	3258209	0.371175	0,371175	CCACATGTGGTTACACCACTGTGTTATCCTTCCACCTGTCCCATCAACCCACCCGCACAT[A/G]TCACAGTGCCTCTGTCCTCAAAGAACACTGTATCCAACACCTCCACATCCTCTCAGCATG
BICF2G63016662	115	X	72647220	0.615878	0,384122	ATTCCTATGGTGGGCGCTGCACATTTCCTCCCAGGGGAAGGGCAAGGGTCCTGCATTTCT[A/G]TGCTTTCCAGGGCCTCCGCACCAAGAGCAATTGCTAGGTCACGCATGCCCCTGCACTTCC
BICF2G63017854	116	X	70302610	0.606541	0,393459	CATGTCATCACTAACTAATTTATTAACAAGAGTTTTATTCTTTGAAAAACAAAATCACTC[A/G]CATTACTCAGTTGCTTATTCCTTGATTCATATACAAATGACTGATAACATGAGATAAAAA

Tabela IV -continuação-

SNP	SEQ ID NO:	Cromossomo em canfam 2	Localização em canfam 2	Frequência de Alelo	Frequência de Alelo Menor	SNP Sequência SNP = [base do tipo selvagem/base alternativa]
BICF2P170917	117	32	38039478	0.600592	0,399408	GATGATTTAGTTGTTTGAATGATCTGGCATATAAATCTTCCAAATCTGTGTCCATTGGAT[T/C]GCTTACAGTTTAATCTTTTTATTTCTTCCCAGAATCACATTTTTTCATTATTTATCTTTG
BICF2G630588207	118	32	38333881	0.425201	0,425201	AGTTAAATTCTGTGAATAACTAGAATCCGTTATACTTTTTCTGAAATGAAGTCTGTAGGC[A/T]TTTCAACAGCAAAAGGAATTCTGWTTTTYAAAACTATACATAATGCTTCTTAAAAGCCCT
BICF2P702899	119	32	39207136	0.428854	0,428854	AATGCCAACTTTAAAAACGCATTCAAGGTTTTCCTCTGTAAATGCATTCCTCATTTTGGA[T/C]GTGATGTAAAATCTTATTCAGTGTTTTGTTTTTTTTTCCCCCCACAGGTCTCAACAATTA
BICF2P1388432	120	8	7178740	0.446203	0,446203	GGTGGGACCGGCCATCAGCAGGCGGGCCAGCGCCCCACAGATGTTGTCACGGACCCGATC[A/G]TGGCGCTCCCGTGCCAGGAGGGGCAACAGAAGCCCCAGCAGCTTGGGGAAGTATCTGGTT
BICF2P588571	121	32	37214320	0.454635	0,454635	AGGGGACTTGTGCTAATCACTGGGCAAATTTTATGAACTTCTGAATTTTAAAGCAAAAGA[A/G]AAGGTGAAAGAATGGAAAGAAGGTGTGAGTGTTTGAGGAAAACTTCTTCTTTGGGGTTGA
BICF2S22912518	122	8	6934693	0.544872	0,455128	TACACAAGCAAGGCAGTATGCCCTGTCTCCTTCCCTTGGGCCACCTGCACTTAGACATGG[T/C]AGGTTCCAGTGATGTGTCTAGTCTCTAGCAAGCAGGGCTTGCTTCTGCTCTATCCATCCA
BICF2P223099	123	8	7427438	0.530602	0,469398	CTGTCCTTGGTCTGGACCTGCTGTGAAGACCAAGTGCTTCCTGAGATCTCTCTGAGTCTA[A/G]TTTCCAGAGCAGTGAGTGAGAAATGAAATGAGCCGAGGATTGCCCTCCCTCCTATGGACT

Tabela IV -continuação-

SNP	SEQ ID NO:	Cromossomo em canfam 2	Localização em canfam 2	Frequência de Alelo	Frequência de Alelo Menor	SNP Sequência SNP = [base do tipo selvagem/base alternativa]
BICF2P568891	124	8	7938712	0.475321	0,475321	TAAGCCATCAGCATGGGCTCCTAGGGGTCTGTTCAACTCCCTTGTGGTGTCTTACTGCTC[A/G]AGCAAAGGAACAGTCTGGTACAGTGGGAGCAAGAGCTGAGGTTGGAGAGTGGGGACACAG
BICF2G63019507	125	X	60714796	0.521308	0,478692	GAGGAGGTGGAAGTCATTAAGTTTAAAATTTCTGGGGTGGTTTCTGGCGACATGAAGCTG[A/C]GAGCTAGAATGCCTTTCAATCTCATAATTTCTTTAATTTGGTGATTATACCAGAGCCACA
BICF2P814468	126	32	37551101	0.517787	0,482213	CCTGACAAACACTACCTCTGCTCTTCAAAAGCAATAAGCATTTATTCTGTGACACATTTA[A/G]ATACAAAGTCAATTACAATAGAGTATAAGTACAATACTAGGGAAAGTACAAAGTCATAYG
BICF2P948321	127	32	37526448	0.511834	0,488166	GCATGATGAAATCAGAAAAAGTATGTAAGTTTCTAGAAGAAGCTAGATATATGGTAACTT[A/T]GGTCAAATAGAACCATGTAGTGAAAAGAATATGAGTTTTCAAGTTCAATAAAAAACAAAA
BICF2P807378	128	32	37648000	0.510848	0,489152	ATGCATAAGTTTCCAAAAGAGTTCAGGATTCCAAAATAAAAGCTTCACTAAAAGATTCAT[A/C]GCAAAAGAGTAATGAACAATTAAAGTCATAGGATATCTAAAATGAAAAACTGTTAGACTG
BICF2P175415	129	8	6494289	0.489645	0,489645	AGATGGCTTAGTTGTTTCTCTTTCCTCCTGAAGTCCACAGCTTAGTTACTTGGACTCTCC[A/G]AAATaggatcgttggacatttgaggaaagctctagcatgaaagccatagactaaaaaca

Exemplo 2

SUMÁRIO

O objetivo do estudo foi investigar se a gerência dietética é eficaz em influenciar concentrações de cobre hepático em Labradores após o tratamento com penicilamina, e se o tratamento adicional com zinco é útil.

O estudo foi conduzido em um grupo de 24 cães que consiste em 12 fêmeas e 12 Labradores machos com pedigree. Os cães eram membros da família de pacientes anteriores com hepatite crônica associada ao cobre. No início da dieta os cães da triagem eram clinicamente saudáveis, mas as concentrações de cobre hepático de 20 cães estavam acima da faixa de referência de 400 mg/kg de peso seco (média: 894, faixa: 70-2810 mg/kg de peso seco). Estas concentrações foram medidas após a conclusão do tratamento com penicilamina.

Todos os cães foram alimentados com a mesma dieta. O tratamento adicional consistiu em gluconato de zinco (7,5mg/kg PO BID, grupo 1) ou em um placebo (grupo 2). O farmacêutico era a única pessoa ciente dos alocamentos do grupo até a conclusão do estudo. As concentrações de cobre hepático e a histopatologia foram avaliadas junto com os exames clínicos e trabalho com sangue antes e depois do tratamento por uma média de 8 meses (faixa 5-13), e 16 meses (faixa 12-25). As concentrações de zinco no plasma foram medidas em pontos de tempo adicionais durante o tratamento.

Vinte e um cães Labradores completaram o estudo. No início do estudo a idade média dos cães no grupo I era de 4,1 anos (faixa de 2,7 – 8,3). Seis cães eram fêmeas (5 castradas, 1 intacta), e seis eram machos (2 castrados, 4 intactos). A idade média dos cães no grupo 2 era 4,8 anos (faixa de 3,6 – 11,2). Seis cães eram fêmeas (4 castradas, 2 intactas), e 6 cães eram machos (2 castrados, 4 intactos). Vômito, anorexia, e diarreia foram observados como efeitos colaterais em 3 cães do grupo suplementado com gluconato de zinco.

Havia uma diferença significativa nas concentrações de cobre hepático em ambos os grupos com gerência dietética no decorrer do tempo

(8 meses: grupo 1 $p < 0,001$, grupo 2 $p = 0,001$, e 16 meses: grupo 1 $p = 0,03$, grupo 2 $p = 0,04$). Entretanto, não havia nenhuma diferença nas concentrações de cobre hepático entre os grupos, antes do tratamento ($p = 0,65$), na reavaliação-1 ($p = 0,52$), e na reavaliação-2 ($p = 0,79$), sugerindo que não há nenhum benefício de suplementação adicional de zinco no acúmulo de cobre hepático.

Os resultados deste estudo mostram que a gerência dietética pode ser eficaz em diminuir as concentrações de cobre hepático em Labradores. O tratamento secundário com zinco não amplificou o efeito de tirar o cobre.

O estudo será descrito agora mais detalhadamente.

MATERIAIS E MÉTODOS

Labradores Retriever

A população de estudo consistiu em 24 Labradores Retriever com pedigree que eram membros da família dos cães descritos previamente com CACH. Todos os cães foram registados no clube da raça Labrador Retriever Holandês.

Todos os cães completaram seu tratamento com penicilamina antes do começo deste estudo. Uma história médica foi obtida de todos os cães e um exame físico foi realizado. Amostras de sangue Na-citrado foram tomadas para análise de um perfil de coagulação, incluindo tempo de protrombina (PT), tempo de tromboplastina parcial ativada (aPTT) e fibrinogênio. Sangue com heparina e EDTA foi amostrado para a análise de enzimas de fosfatase alcalina hepatobiliares (ALP), alanina aminotransferase (ALT), de ácidos biliares (BA), e para a medida da contagem de plaquetas, e concentrações de zinco no plasma. Biópsias do fígado foram tomadas de acordo com a técnica de Menghini dada por Rothuizen (Rothuizen J, I.T. (1998) Tijdschr Diergeneeskd 123: 246 - 252). Pelo menos três biópsias do fígado foram tomadas de cada cão. Duas biópsias foram fixadas em 10 por cento de formalina tamponada neutra, e uma biópsia foi armazenada em um recipiente livre de cobre para determinação quantitativa de cobre.

Todas as biópsias foram histologicamente avaliadas. O tecido

hepático foi corado com mancha de ácido rubeânico para a avaliação da distribuição de cobre e semiquantificação como descrito previamente (Van den Ingh T.S.G.A.M., R.J., Cupery R. (1988) Vet Q 10: 84 - 89). De acordo com o sistema de classificação aplicado as contagens de cobre acima de 2 são anormais (0: nenhum cobre, 1: células do fígado solitárias e/ou células reticulohistocíticas (RI-IS) contendo alguns grânulos positivos de cobre, 2: grupos pequenos de células de fígado e/ou de células RHS contendo quantidades pequenas a moderadas de grânulos positivos de cobre, 3: grupos ou áreas maiores de células de fígado e/ou de células RHS contendo quantidades moderadas de grânulos positivos de cobre, 4: áreas largas de células de fígado e/ou de células RHS com muitos grânulos positivos de cobre, 5: presença difusa de células de fígado e/ou de células RHS com muitos grânulos positivos do cobre).

Um ensaio quantitativo para o cobre no tecido do fígado foi realizado por uma análise de ativação de nêutron, de acordo com um protocolo descrito por Teske et al, usando os aparelhos descritos por Bode (Bode, P. (1990) Journal of Trace and Microprobe Techniques: 8 139; Teske et al (1992) Vet Rec 131: 30 - 32). Concentrações de cobre quantitativas foram medidas em biópsias liofilizadas do fígado e relatadas em mg/kg de peso seco do fígado.

Aparte do conteúdo de cobre, mudanças histológicas adicionais foram classificadas em uma escala entre 0 e 5 a fim de permitir o teste estatístico (0 = nenhum sinal histológico de inflamação, 1 = hepatite reativa, 2 = hepatite crônica branda, 3 = hepatite crônica moderada, 4 = hepatite crônica severa, 5 = cirrose).

O estudo foi aprovado pelo Utrecht University Institutional Animal Care e Use Committee. O consentimento do proprietário informado foi obtido para todos os cães.

Progressão do acúmulo de cobre hepático sem tratamento

A medida de concentrações de cobre hepático de onze cães foi repetida depois de uma média de 8,7 meses (faixa de 6-15 meses), antes de qualquer tratamento. Durante este tempo todos os animais foram alimenta-

dos com sua dieta de manutenção usual, que continha concentrações de cobre dietéticas entre 12-25 mg/kg de matéria seca e concentrações de zinco entre 80-270 mg/kg de matéria seca de acordo com os fabricantes.

Dieta

Todos os proprietários dos cães foram fornecidos com a mesma dieta especialmente fabricada. Análise aproximada da dieta como alimentada: umidade 57,9%, proteína crua 6,1%, gordura crua 5,9%, minerais 1,7%. Energia metabolizável (medida de acordo com o protocolo da Association of American Feed Control Officials): 1650 kcal/kg como alimentados). A dieta continha cobre em uma concentração de 4,75 mg/kg de matéria seca, e zinco em uma concentração de 102 mg/kg de matéria seca. Os cães foram alimentados com a dieta sem suplementos dietéticos adicionais e banquetes. Os Labradores deste estudo receberam entre 420 e 840g de dieta/dia.

Estudo farmacocinético

Dois Labradores Retriever saudáveis de nove anos de idade não relacionados (1 fêmea e 1 macho) foram usados em um estudo farmacocinético. O alimento foi retido por um período de 12 horas antes da administração oral de zinco, e durante o período inicial de teste de 6 horas. A água estava livremente disponível. Gluconato de zinco oral foi administrado em uma dose de 10 mg/kg no cão 1, e em uma dose de 5 mg/kg no cão 2. Amostras de sangue heparinizadas (4 ml) foram coletadas da veia de jugular antes de dosar (tempo 0) e em 15, 30, 45, 60, 90, 120 minutos, e em 4, 8, 12 e 24 horas após a aplicação do fármaco. O plasma foi armazenado a -20°C até a análise de zinco usando espectrometria de absorção atômica.

Preparação do fármaco, randomização, e cegueira

A escolha pelo gluconato de zinco foi feita baseado em nossa observação clínica que o fármaco tem poucos efeitos colaterais em relação a outros sais, como acetato ou sulfato. Os comprimidos foram fornecidos pela Farmácia Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade de Utrecht. Os comprimidos de zinco continham 25 mg de zinco elementar como sal de gluconato de zinco (Toppharm Zink 25 gluconaat, Parmalux BV, Uitgeest, NL). Os comprimidos de placebo continham a 160 mg de lactose

(Albochin, Pharmachemie BV, Haarlem, NL). Os comprimidos de ambos os grupos tinham aparência idêntica.

O farmacêutico randomizou os alocamentos do grupo em perspectiva para conjuntos de seis cães jogando uma moeda. Três cães receberam o placebo, e três cães foram tratados com o zinco. Na prescrição do médico, os comprimidos (placebo ou zinco) foram dispensados de acordo com uma tabela de randomisação.

A dosagem da prescrição foi de acordo com o seguinte esquema:

Peso do corpo:

< 28 kg (61,6 lbs):	8 Comprimidos	BID(200mg BID)
28 - 35kg (61,6 – 77 lbs):	9 Comprimidos	BID (225mg BID)
Acima de 35 (> *77 lbs):	10 Comprimidos	BID(250mg BID)

Os proprietários foram instruídos a dar os comprimidos misturados com pequenas quantidades de sua dieta 30 minutos antes da alimentação. Nem o proprietário, nem o médico foram informados sobre qual tratamento cada cão recebeu. A tabela de randomização permaneceu na posse da Farmácia durante a triagem e foi somente revelada após a conclusão da triagem.

Análise estatística

Os parâmetros farmacocinéticos (WinNonlin 4.0.1. (Pharsight Corporation, 800 West El Camino Real, Mountain View, CA, USA) e análise estatística (SPSS 11.0 para windows, 2001, SPSS Inc., Chicago, IL, USA) foram calculados por meio de pacotes de software disponíveis no comércio. Devido aos tamanhos pequenos de grupo, um teste estatístico não-paramétrico foi usado para a comparação entre os grupos. Um teste de Mann-Whitney foi usado para detectar uma diferença entre concentrações de cobre hepático antes e depois do tratamento com dieta e gluconato de zinco (grupo 1) em dois exames de controle (reavaliação-1 e reavaliação-2), e após o tratamento com dieta e placebo (grupo-2) em ambos os exames do controle. Além disso, o teste foi usado para detectar uma diferença entre o grupo-1 e o grupo-2 antes do estudo, na reavaliação-1, e na reavaliação-2 (nível de significância $p \leq 0,05$).

RESULTADOS

Progressão do acúmulo de cobre hepático sem tratamento

A medida de concentrações de cobre hepático em onze cães Labrador foi repetida antes que qualquer tratamento tivesse sido dado, e enquanto os cães foram alimentados com sua dieta de manutenção usual. Em todos, com a exceção de um cão, as concentrações de cobre hepático aumentaram durante o intervalo de tempo de 8,7 meses entre ambas as medidas de uma média de 1000 mg/kg de peso seco (faixa de 290-2370) a uma média de 1626 mg/kg de peso seco (faixa de 630-3610). Relativo ao peso corporal dos pacientes (média: 33,9 kg, faixa de 25-39,5 kg) isto foi um aumento de 18 mg de cobre por kg do peso corporal durante 8,7 meses. Os resultados são mostrados na figura 1.

Estudo Farmacocinético

Os parâmetros farmacocinéticos calculados a partir das concentrações de zinco no plasma medidas em dois cães após uma aplicação oral de 10 mg/kg (cão 1) e 5 mg/kg (cão 2) de zinco elementar foram:

Cão 1 (10 mg/kg): V_F: volume de distribuição = 2937,872 ml/kg de peso corporal, K01: constante da taxa de absorção = 0,567212 1/hora, K10: constante da taxa de eliminação = 0,053728 1/hora, AUC: área sob a curva = 63,35272 hr*µg/ml, Cl_F: depuração em relação à biodisponibilidade = 157,8464 ml/hr/kg, Tmax: tempo de concentração máxima = 4,589813 horas, Cmax: depuração máxima = 2,659924 µg/ml)

Cão 2 (5 mg/kg): V_F: volume de distribuição = 2538,689 ml/kg de peso corporal, K01: constante da taxa de absorção = 1,160647 1/hora, K10: constante da taxa da eliminação = 0,037886 1/hora, AUC: área sob a curva = 51,98513 hr*µg/ml, Cl_F: depuração em relação à biodisponibilidade = 96,18135 ml/hr/kg, Tmax: tempo de concentração máxima = 3,047974 horas, Cmax: depuração máxima = 1,754728 µg/ml).

A meia-vida calculada de zinco foi t1/2= 15,1 horas.

A taxa de acúmulo R calculada foi 1,52, de R=1/(1-exp (- k10*24). O intervalo da dose foi escolhido como sendo 12 horas. Uma estimativa da dose foi 127,0139 ml/hr/kg, calculada da média do CL_F de am-

bos os cães.

Uma estimativa da dosagem apropriada foi baseada em uma concentração máxima pretendida de zinco no plasma de 5 µg/ml. Dosagem = Cl_F x concentração do sangue pretendida x intervalo da dose = 7,62 mg/kg q 12 horas

Triagem de dieta e aplicação de zinco randomizada, controlada por placebo

No início da triagem da dieta as concentrações de cobre hepático de 20 cães estavam acima da faixa de referência de 400 mg/kg de peso seco (média: 894, faixa: 70-2810 mg/kg de peso seco). Os resultados da avaliação semiquantitativa de cobre variaram de 0 a 4,5. O exame histopatológico de biópsias do fígado de 17 cães revelou um conteúdo de cobre hepático elevado (acima de 2), que foi localizado nos hepatócitos centrolobulares. A coloração para o cobre foi normal em 5 cães, e resultados de coloração normal altos foram obtidos a partir das biópsias de 2 cães com cobre hepático elevado da análise quantitativa. Em sete cães a hepatite crônica estava presente. A CH foi caracterizada por vários graus de apoptose e necrose hepatocelular, inflamação mononuclear, regeneração e fibrose. A atividade da inflamação hepática foi determinada pela quantidade de inflamação e extensão da apoptose e necrose hepatocelular. O estágio da doença foi determinado pela extensão e o padrão de fibrose e a presença de cirrose da hepatite foi branda em 4 pacientes, moderada em 2 cães, e a cirrose foi diagnosticada em 1 cão. Em treze cães não havia nenhum sinal histológico de inflamação presente no fígado, e nas biópsias de 4 cães a histopatologia revelou mudanças reativas.

No início do estudo a idade média dos cães no grupo 1 era de 4,1 anos (faixa 2,7 - 8,3). Seis cães eram fêmeas castradas, e seis eram machos (2 castrados, 4 intactos). A média do peso corpal foi 33 kg (faixa 26,2 - 37,5). A concentração de cobre hepático média dos cães no grupo 1 era de 961 mg/kg de peso seco (faixa 340 - 2810). A avaliação semiquantitativa média do cobre a partir da coloração histológica era de 2 - 3 (faixa 0 - 4,5).

A idade média dos cães no grupo 2 era de 4,8 anos (faixa 3,6 - 11,2). Seis cães eram fêmeas (4 castradas, 2 intactas), e 6 cães eram ma-

chos (2 castrados, 4 intactos). A média do peso corporal era de 32,3 kg (faixa 25 - 41,9). A concentração de cobre hepático média de cães do grupo 2 era de 861 mg/kg de peso seco (faixa 70 - 1680). Não havia nenhuma diferença nas concentrações de cobre hepático entre ambos os grupos antes do tratamento (p = 0,73). A avaliação semiquantitativa média de cobre a partir da coloração histológica era de 2 – 3+ (faixa 0,5 - 3).

Três cães do grupo-1 não completaram o estudo. A razão para a descontinuação não foi relacionada ao tratamento em todos os três cães (um proprietário sentiu que seu cão estava ficando muito velho, um proprietário teve razões pessoais, e um cão desenvolveu um tumor de mastócitos). Vinte e um cães completaram o estudo, com pelo menos um exame de controle (reavaliação-1). Em dezesseis cães as biópsias do fígado foram obtidas em um ponto de tempo posterior adicional (reavaliação-2).

Vômito, e anorexia foram efeitos adversos observados em 3 cães do grupo 1. Um destes cães também teve diarreia de intestino delgado transiente. Os efeitos adversos ocorreram imediatamente depois da aplicação dos comprimidos, e foram resolvidos quando os comprimidos foram misturados com a dieta.

Exames de sangue

A concentração de ácidos biliares diminuiu a partir de uma média de 14 µmol/l (faixa: 3 - 101), a uma média de 7,8 (faixa: 1 - 39) na reavaliação-1 e 7,1 (faixa: 0 - 21) na reavaliação-2. A concentração média de fosfatase alcalina (ALP), e alanina aminotransferase (ALT) permaneceram dentro da faixa normal em todos os exames. A concentração média de ALP antes do tratamento era de 41 U/l (faixa: 8 - 111), na reavaliação-1: ALP médio = 37 U/l (faixa 12 - 143), na reavaliação-2: ALP médio = 37 U/l (faixa: 19 - 152). A concentração média de ALT antes do tratamento era de 28 U/l (faixa: 10 - 234), na reavaliação-1: ALT médio = 47 U/l (faixa: 11 - 78), na reavaliação-2: ALT médio = 51 U/l (26 - 68).

No início do estudo as concentrações médias no plasma de zinco eram de 95 µg/dl e 96 µg/dl no grupo-1 e no grupo-2 respectivamente. Não havia nenhuma diferença nas concentrações de zinco no plasma de um

ou outro grupo na reavaliação-1 e na reavaliação-2 (valores p entre 0,11 e 0,79). Nenhuma diferença na concentração de zinco no plasma foi encontrada entre o grupo 1 e o grupo 2 em qualquer um dos três exames (valores p entre 0,34 e 0,5). O único ponto do tempo em que uma diferença nas concentrações de zinco no plasma poderia ser encontrada era um exame de sangue após o mês inicial do tratamento com zinco no grupo 1. A amostragem de sangue foi realizada 2-6 horas após a aplicação de zinco. Neste exame de controle a concentração média de zinco no plasma tinha aumentado para 165 µg/dl (faixa 117 - 249, p = 0,02).

Medidas de cobre hepático

A medida quantitativa do cobre hepático melhorou durante o tratamento em ambos os grupos. Na reavaliação-1, e na reavaliação-2, as concentrações de cobre hepático diminuíram significativamente em ambos os grupos de cães, comparados ao ponto de partida (grupo-1 na reavaliação-1: média 286 mg/kg, faixa 84 - 700, $p \leq 0,001$; grupo-1 na reavaliação-2: média 421 mg/kg, faixa 220 - 790, p = 0,03, grupo-2 na reavaliação-1: média 277 mg/kg, faixa 80 - 450, p = 0,001, grupo-2 na reavaliação-2: média 401 mg/kg, faixa 118 - 850, p = 0,04). Não havia nenhuma diferença nas concentrações de cobre hepático entre ambos os grupos na reavaliação-1 (p = 0,52), e não havia nenhuma diferença entre os grupos na reavaliação-2 (p = 0,79). Além disso, não havia nenhuma diminuição adicional de concentrações de cobre hepático entre a reavaliação-1, e a reavaliação-2 (grupo-1 p = 0,44, grupo-2 p = 0,25). Os resultados são mostrados na figura 2.

Histologia

A coloração histológica para o cobre melhorou com o tratamento. Pontuações histológicas para avaliação semiquantitativa de cobre diminuíram no grupo 1 e no grupo 2 na reavaliação-1 e reavaliação-2 comparados ao ponto de partida (grupo 1 na reavaliação-1: p = 0,031, grupo 1 na reavaliação-2: p = 0,01, grupo 2 na reavaliação-1: p = 0,01, grupo 2 na reavaliação-2: p = 0,001). Não havia nenhuma diferença entre ambos os grupos em qualquer ponto de tempo (p = 0,16 – 0,75).

A pontuação histológica para a gravidade da inflamação do fíga-

do permaneceu inalterada durante todos os exames dos cães de ambos os grupos (p = 0,25 - 0,45).

CONCLUSÃO

A fim de fornecer pacientes com CACH com um controle a longo prazo mais equilibrado de concentrações de cobre hepático, o objetivo deste estudo era investigar se a gerência dietética é eficaz em influenciar concentrações de cobre hepático em Labradores após o tratamento com penicilamina, e se o tratamento adicional com zinco é útil. Os resultados deste estudo mostram que a gerência dietética pode ser eficaz em diminuir concentrações de cobre hepático. O tratamento secundário com zinco não amplificou o efeito de diminuição de cobre.

Exemplo 3

Durante uma investigação do efeito de zinco na concentração de cobre hepático, a concentração de cobre hepático foi medida em 18 Labradores Retriever com pedigree. A metade dos cães foi fornecida com um suplemento de zinco e a outra metade foi fornecida com um placebo. Todos dos cães foram alimentados com a dieta do Exemplo 2. A concentração de cobre hepático foi medida usando o método do Exemplo 2 em 3 pontos do tempo: (1) antes do tratamento com penicilamina; (2) após o tratamento com penicilamina mas antes do tratamento com a dieta do Exemplo 2; e (3) após o tratamento da dieta. Como no Exemplo 2, não houve nenhuma diferença significativa entre os níveis de cobre nos cães tratados com zinco e com placebo (dados não mostrados). Entretanto, o uso da dieta teve um efeito significativo nos níveis de cobre. Os resultados combinados para os cães tratados com zinco e com placebo são mostrados na figura 3 e demonstram que a dieta de baixo cobre tem um efeito mais significativo em reduzir os níveis de cobre no fígado do que a penicilamina sozinha.

Exemplo 4

Um exemplo de gênero alimentício da invenção é exposto abaixo:

Ingrediente (%)	100
Água	47,4
Cereais	28,5
Subprodutos vegetais	1,7
Ovo e subprodutos de ovo	1,5
Carne e subprodutos animais	17
Óleo e gordura	2
Minerais e vitaminas	1,9

Uma análise típica das quantidades de minerais e de elementos de traço nestes gêneros alimentícios, junto com o método usado, é fornecida como segue:

Análise	Resultado (% de peso como alimentação ou mg/kg de matéria seca)	Notas
Umidade	63 %	Perda por secagem a 105 °C por 5 horas
Proteína	6,5 %	Proteína por Kjeldahl usando fator de nitrogênio 6,25
Gordura	4,2 %	Hidrólise ácida e extração de éter de petróleo
Cinza	2,2 %	Programa de elevação de temperatura de 16hr, cinza final a 550°C por 5 hr
Fibra crua	1,4 %	EC método OJ L344 26/11/92 P35, Diretiva 92/89
Cobre	5,4 mg/kg	Por espectrofotometria de absorção atômica de chama
Zinco	229 mg/kg	Por espectrofotometria de absorção atômica de chama
Ferro	62 mg/kg	Por espectrofotometria de absorção atômica de chama
Cálcio	9 460 mg/kg	Por espectrofotometria de absorção atômica de chama
Fósforo	5 405 mg/kg	Por reação colorimétrica

Exemplo 5

Um exemplo adicional de gêneros alimentícios da invenção é como segue:

Ingrediente (%)	100
Cereais	39,7
Subprodutos vegetais	8,0
Extrato de proteína vegetal	5,0
Carne e subprodutos animais	35,6
Óleo e gordura	7,5
Minerais e vitaminas	4,2

Uma análise típica das quantidades de minerais e de elementos de traço nestes gêneros alimentícios, junto com o método usado, é fornecida como segue:

Análise	Resultado (% de peso como alimentação ou mg/kg de matéria seca)	Notas
Umidade	8,0 %	Perda por secagem a 105 °C por 5 horas
Proteína	30,0 %	Proteína por Dumas usando fator de nitrogênio 6,25
Gordura	13,0 %	Hidrólise ácida e extração de éter de petróleo
Cinza	6,3 %	Programa de elevação de temperatura de 16hr, cinza final a 550°C por 5 hr
Fibra crua	4,1 %	EC método OJ L344 26/11/92 P35, Diretiva 92/89
Cobre	10,9 mg/kg	Por espectrofotometria de absorção atômica de chama
Zinco	245 mg/kg	Por espectrofotometria de absorção atômica de chama
Ferro	217 mg/kg	Por espectrofotometria de absorção atômica de chama
Cálcio	1 087 mg/kg	Por espectrofotometria de absorção atômica de chama
Fósforo	760 mg/kg	Por reação colorimétrica

REIVINDICAÇÕES

1. Uso do cobre na preparação de um gênero alimentício para um cão que tem herança genética da raça Labrador Retriever, caracterizado pelo fato de que o gênero alimentício compreende cobre em uma concentração de pelo menos 4,5 a menos do que 12 mg/kg de matéria seca, e zinco em uma concentração de pelo menos 120 mg/kg de matéria seca, e é para prevenir uma doença atribuível ao acúmulo de cobre no fígado do referido cão.

2. Uso, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que é para prevenir uma doença atribuível ao acúmulo de cobre no fígado em um cão determinado a ser suscetível ao acúmulo de cobre no fígado por um método compreendendo detectar a presença ou a ausência de um ou mais polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) selecionado(s) de BICF2P506595 (SEQ ID NO: 1), BICF2P772765 (SEQ ID NO: 2), BICF2S2333187 (SEQ ID NO: 3), BICF2P1324008 (SEQ ID NO: 4) e BICF2P591872 (SEQ ID NO: 5).

3. Uso, de acordo com a reivindicação 2, caracterizado pelo fato de que o cão foi determinado ser suscetível ao acúmulo de cobre no fígado por um método compreendendo detectar a presença ou ausência dos SNPs BICF2P506595 (SEQ ID NO: 1), BICF2P772765 (SEQ ID NO: 2), BICF2S2333187 (SEQ ID NO: 3), BICF2P1324008 (SEQ ID NO: 4), e BICF2P591872 (SEQ ID NO: 5).

4. Uso, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3, caracterizado pelo fato de que é para a prevenção de uma doença atribuível ao acúmulo de cobre no fígado em um cão:

(i) tendo pelo menos um progenitor que é um Labrador Retriever puro; e/ou

(ii) que não tenha nenhum sintoma clínico associado com o acúmulo de cobre no fígado; e/ou

(iii) que tenha uma concentração de cobre no fígado menor do que 400 mg/kg de peso seco do fígado; e/ou

(iv) que não tenha doença hepática detectável.

5. Uso, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 4, caracterizado pelo fato de que ser para a prevenção de hepatite crônica associada ao cobre.

6. Uso de um gênero alimentício compreendendo cobre em uma concentração de pelo menos 4,5 a menos do que 12 mg/kg de matéria seca, e zinco em uma concentração de pelo menos 120 mg/kg de matéria seca, caracterizado pelo fato de ser para a preparação de um medicamento para prevenir uma doença atribuível ao acúmulo de cobre no fígado em um cão que tem a herança genética da raça Labrador Retriever.

7. Método para determinar a suscetibilidade de um cão ao acúmulo de cobre no fígado, o método caracterizado pelo fato de que compreende:

(a) entrada para dados do sistema de computador em relação à presença ou à ausência no genoma do cão de um polimorfismo como definido na reivindicação 2 ou 3;

(b) comparar os dados a uma base de dados de computador, em que a base de dados compreende informação em relação a um ou mais polimorfismos como definido(s) na reivindicação 2 ou 3 e sua associação com a suscetibilidade de um cão ao acúmulo de cobre no fígado; e

(c) determinar com base na comparação a suscetibilidade de um cão ao acúmulo de cobre no fígado, em que a presença de um ou mais SNPs selecionados de BICF2P506595 (SEQ ID NO: 1), BICF2P772765 (SEQ ID NO: 2), BICF2S2333187 (SEQ ID NO: 3), BICF2P1324008 (SEQ ID NO: 4) e BICF2P591872 (SEQ ID NO: 5) é indicativo de suscetibilidade do cão ao acúmulo de cobre no fígado.

Fig.1

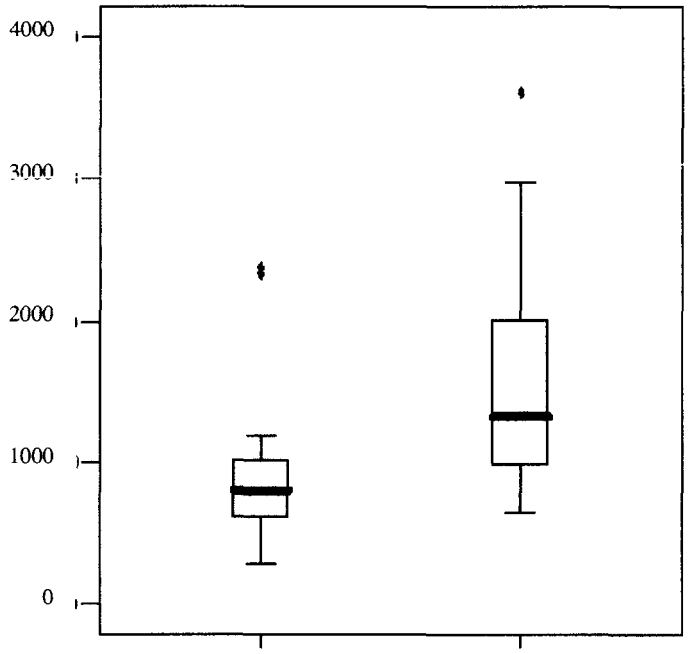
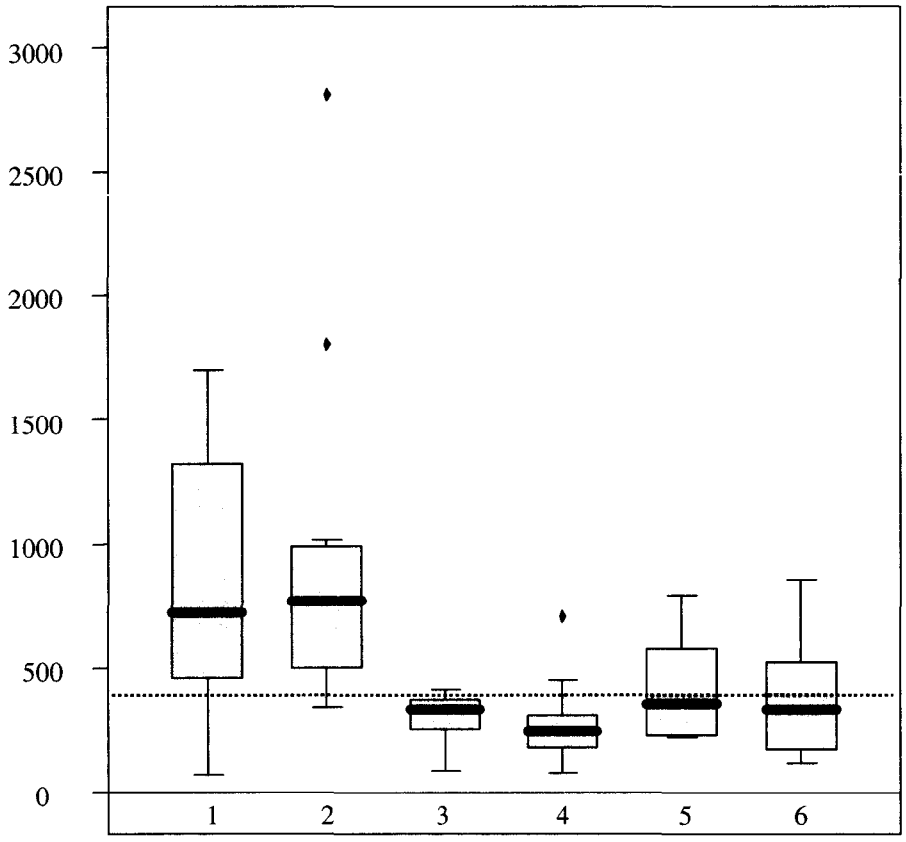


Fig.2



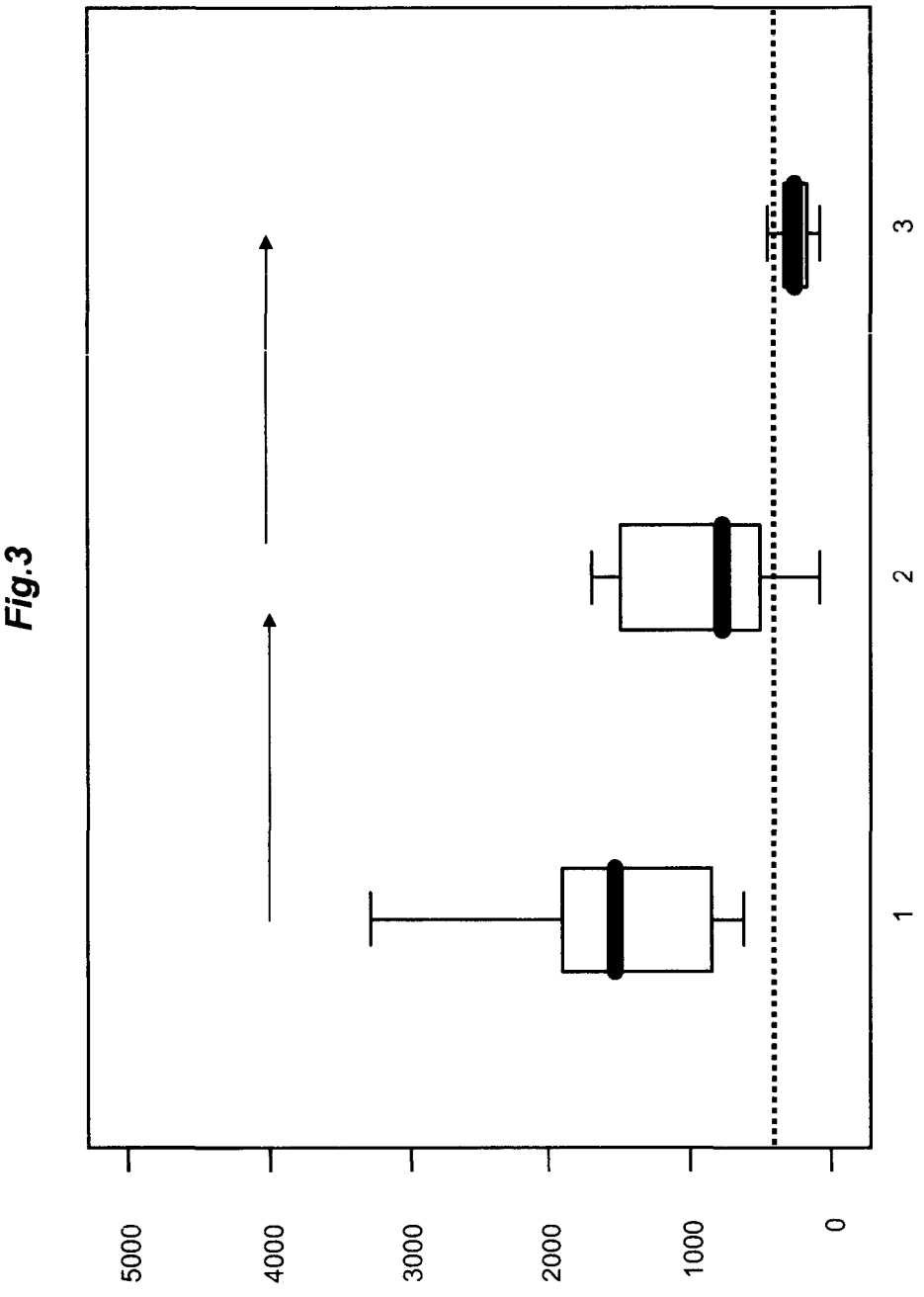
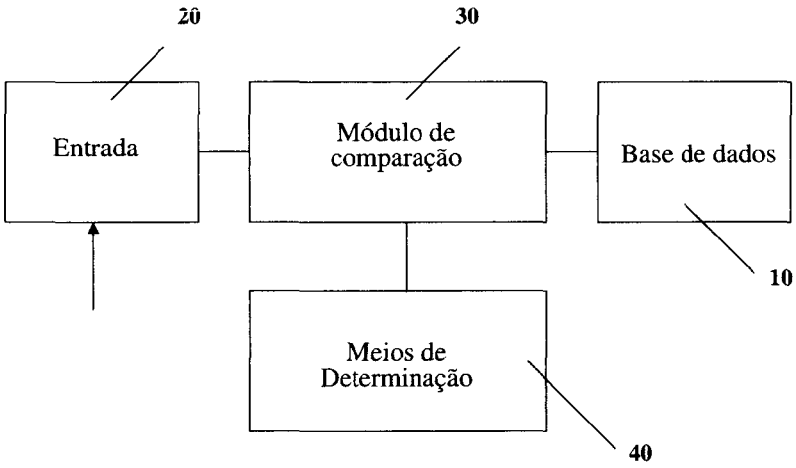


Fig.3

Fig.4


20
30
Entrada
Módulo de comparação
Base de dados
10
Meios de Determinação
40