

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

PREVALÊNCIA DE EQUINOS QUARTO DE MILHA  
PORTADORES DAS MUTAÇÕES CAUSADORAS DA MIOPATIA  
POR ACÚMULO DE POLISSACARÍDEO TIPO I, PARALISIA  
PERIÓDICA HIPERCALÊMICA E HIPERTERMIA MALIGNA NO  
BRASIL

DIEGO JOSÉ ZANZARINI DELFIOL

BOTUCATU –SP

Agosto de 2014

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

PREVALÊNCIA DE EQUINOS QUARTO DE MILHA  
PORTADORES DAS MUTAÇÕES CAUSADORAS DA MIOPATIA  
POR ACÚMULO DE POLISSACARÍDEO TIPO I, PARALISIA  
PERIÓDICA HIPERCALÊMICA E HIPERTERMIA MALIGNA NO  
BRASIL

DIEGO JOSÉ ZANZARINI DELFIOL

Tese apresentada junto ao Programa de Pós-  
Graduação em Medicina Veterinária para  
obtenção do título de Doutor.

Orientador: Prof. Dr. Alexandre Secorun  
Borges

Coorientador: Prof. Dr. José Paes de Oliveira  
Filho

BOTUCATU –SP

Agosto de 2014

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.  
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP  
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE - CRB 8/5651

Delfiol, Diego José Zanzarini.

Prevalência de equinos quarto de milha portadores das mutações causadoras da miopatia por acúmulo de polissacarídeo Tipo I, paralisia periódica hipercalêmica e hipertermia maligna no Brasil / Diego José Zanzarini Delfiol. - Botucatu, 2014

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

Orientador: Alexandre Secorun Borges

Coorientador: José Paes de Oliveira Filho

Capes: 50501062

1. Equino - Doenças. 2. Músculos - Doenças - Aspectos genéticos. 3. Doenças hereditárias. 4. Polissacarídeos. 5. Genética animal.

Palavras-chave: Doença genética; GYS1; Miopatia; RYR1; SCN4A.

Nome do autor: Diego José Zanzarini Delfiol

Título: Prevalência de equinos quarto de milha portadores das mutações causadoras da miopatia por acúmulo de polissacarídeo tipo I, paralisia periódica hipercalêmica e hipertermia maligna no Brasil.

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr. Alexandre Secorun Borges

Presidente e orientador

Departamento de Clínica Veterinária

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – UNESP - Botucatu

Prof. Dr. Carlos Alberto Hussni

Membro

Departamento de Cirurgia e Anestesiologia Veterinária

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – UNESP - Botucatu

Prof. Dr. Luiz Claudio Nogueira Mendes

Membro

Departamento de Clínica e Cirurgia e Reprodução Animal

Faculdade de Medicina Veterinária – UNESP – Araçatuba

Prof. Dr. Paulo Henrique Jorge da Cunha

Membro

Departamento de Medicina Veterinária

Escola de Veterinária e Zootecnia – UFG – Goiânia

Prof. Dr. Rogério Martins Amorim

Membro

Departamento de Clínica Veterinária

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – UNESP - Botucatu

Data da defesa: 18 de agosto de 2014.

## DEDICATÓRIA

Aos meus pais, MARILZA FERNANDES ZANZARINI DELFIOL e URANDI RIBEIRO DELFIOL, pelo amor incondicional, dedicação, incentivo, compreensão e força.

Aos meus irmãos, CAMILA ZANZARINI DELFIOL e PEDRO RAFAEL ZANZARINI DELFIOL, pelo amor, amizade, apoio e pelos agradáveis momentos que me proporcionam.

Aos meus avós, ORANIDES ZANZARINI e PEDRO ZANZARINI, pelo amor, fé, apoio e conselhos.

## AGRADECIMENTOS

A Deus, por me dar saúde, força e disposição para ir em busca de meus objetivos. *“Sois meu refúgio e minha cidadela, meu Deus, em que eu confio.”*

Ao professor Alexandre Secorun Borges, pela orientação, pelo incentivo, pelas oportunidades, pela confiança, pelos conselhos, pela amizade e agradável convivência.

Ao meu coorientador professor José Paes de Oliveira Filho, pela fundamental ajuda na idealização e execução deste projeto e principalmente pela amizade, pelos conselhos, conversas e pelos inúmeros momentos agradáveis de convivência.

A minha namorada Elisa Sant’Anna Monteiro da Silva, pelo amor, carinho, compreensão, paciência, amizade e por tornar meus dias mais felizes.

Aos amigos Aline Angella, Campo Amor Vieira da Cunha Neto, César Erineudo Tavares de Araújo, Didier Quevedo Cagnini, Giovane Olivo, Juliana Nogueira da Gama, Mariana Isa Poci Palumbo e Peres Ramos Badial, com os quais dividi a inesquecível “salinha” dos pós-graduandos; obrigado pela amizade e convívio durante estes proveitosos anos.

Ao professor João Pessoa Araújo Júnior, pela importante colaboração na execução deste projeto e por ceder o laboratório de diagnóstico molecular para a realização dos sequenciamentos.

As biólogas Camila Dantas Malossi e Vanessa Rafaela de Carvalho pela ajuda na realização dos sequenciamentos.

Ao Médico Veterinário Dr. Peres Ramos Badial, pela ajuda na elaboração do projeto e pela grande colaboração na colheita das amostras.

Ao Médico Veterinário Carlos Ramires Neto, pela ajuda nas colheitas de material e no contato com proprietários e treinadores.

Aos amigos de pós-graduação Danilo Andrade, Carlos Ramires Neto, Dietrich Pizzigatti, Emiliano Cisneros, Leandro Américo, Luiz Mattos e Rodrigo Maciel Cavalcante pela amizade e ajuda durante o curso de doutorado.

Aos alunos de iniciação científica Alexandre Battazza, Carla Pinheiro de Souza pelo auxílio na realização das PCRs e as alunas Luiza Zakia e Roberta Basso pela ajuda com a organização e manutenção do laboratório.

Aos professores do Departamento de Clínica Veterinária, Dr. Roberto Calderon Gonçalves, Dr. Rogério Martins Amorim e Dr. Simone Biagio Chiacchio pelas orientações, ensinamentos e agradável convivência durante esses anos.

Ao professor José Carlos de Figueiredo Pantoja pela cooperação na realização dos cálculos de amostragem e análise estatística.

Aos funcionários da Clínica de Grandes Animais Cesar Leme e Marco Antônio Simão pela ajuda e amizade.

As secretárias do Departamento de Clínica Veterinária, Marlene Dias de Camargo e Izabel Cristina Castro, pela colaboração.

A coordenação e direção da Faculdade de Ensino Superior e Formação Integral (FAEF), pela compreensão e ajuda para que eu pudesse finalizar o curso de doutorado.

A todos os professores da FAEF, em especial a Ernani Andrade, Fernanda Romão, Leandro Rodello, Raquel Ferioli e Roque Raineri Neto, pela ajuda, amizade e companheirismo.

A todos os Médicos Veterinários, proprietários e funcionários dos haras e centros de treinamentos onde as amostras foram colhidas; sem a colaboração destas pessoas este trabalho não seria possível.

Aos profissionais do Curso de Pós Graduação da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – Campus de Botucatu, especialmente ao Prof. Dr. Helio Langoni (Coordenador) e aos funcionários Carlos Pazini Junior (Supervisor), Maria Aparecida Dias de Almeida Manoel e Gláucia Cristina Corrêa de Oliveira, pelo auxílio prestado durante meu curso de doutorado.

A Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia de Botucatu – Unesp, em nome do seu diretor professor Dr. José Paes de Almeida Nogueira Pinto, pelo apoio da instituição para o desenvolvimento desta tese.

A Fundação de Apoio à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP pelo auxílio à pesquisa, possibilitando a execução deste projeto.

A todos que colaboraram de alguma forma para que este trabalho pudesse ser concluído, em especial aos meus familiares e amigos.

**LISTA DE QUADROS****CAPÍTULO II**

Quadro 1	Animais portadores da mutação previamente descrita no gene <i>GYS1</i> causadora de PSSM1.	38
Quadro 2	Prevalência de PSSM1 entre os sexos nas cinco modalidades esportivas e valor de p quando comparado dentro de cada modalidade esportiva e no total de animais amostrados.	39
Quadro 3	Número de amostras colhidas em cada propriedade para as cinco modalidades esportivas estudadas e número de animais com PSSM1 encontrados em cada local.	40
Quadro 4	Locais entre as 41 propriedades amostradas onde foram encontrados cavalos para cada modalidade esportiva, e número de locais onde cavalos com PSSM1 foram encontrados.	41

**LISTA DE TABELAS****CAPÍTULO III**

Tabela 1	Animais portadores da mutação previamente descrita no gene <i>GYS1</i> causadora de PSSM1.	53
Tabela 2	Prevalência de PSSM1 entre os sexos nas cinco modalidades esportivas e valor de p quando comparado dentro de cada modalidade esportiva e no total de animais amostrados.	54

**SUMÁRIO**

<b>CAPÍTULO I</b> .....	1
1. INTRODUÇÃO .....	3
2. REVISÃO DE LITERATURA .....	7
2.1 Miopatia por acúmulo de polissacarídeo (PSSM) .....	7
2.1.1 Etiologia.....	7
2.1.2 Epidemiologia .....	8
2.1.3 Patogênese .....	9
2.1.4 Sinais clínicos.....	9
2.1.5 Patologia clínica.....	10
2.1.6 Diagnóstico.....	11
2.1.7 Diagnóstico diferencial.....	12
2.1.8 Prognóstico.....	13
2.1.9 Tratamento .....	13
2.1.10 Manejo da dieta e programa de exercícios.....	13
2.2 Paralisia periódica hipercalêmica (HYPP) .....	16
2.2.1 Etiologia.....	16
2.2.2 Epidemiologia .....	16
2.2.3 Patogênese .....	17
2.2.4 Sinais Clínicos .....	17
2.2.5 Patologia Clínica.....	18
2.2.6 Diagnóstico.....	18
2.2.7 Diagnóstico diferencial.....	19
2.2.8 Prognóstico.....	19
2.2.9 Tratamento .....	20
2.2.10 Prevenção e controle.....	20
2.3 Hipertermia maligna.....	21
2.3.1 Etiologia.....	21
2.3.2 Epidemiologia .....	21
2.3.3 Patogênese .....	22
2.3.4 Sinais clínicos.....	22
2.3.5 Patologia clínica.....	23
2.3.6 Diagnóstico.....	23

2.3.7 Diagnóstico diferencial.....	24
2.3.8 Prognóstico.....	24
2.3.8 Tratamento .....	24
2.4 Considerações gerais .....	25
<b>CAPÍTULO II</b> .....	27
Abstract.....	28
Resumo .....	29
Introdução.....	30
Material e Métodos .....	31
Resultados.....	33
Discussão .....	33
Referências.....	35
<b>CAPÍTULO III</b> .....	42
RESUMO .....	43
ABSTRACT.....	44
INTRODUÇÃO.....	44
MATERIAL E MÉTODOS .....	46
RESULTADOS .....	48
DISCUSSÃO.....	49
CONCLUSÃO .....	50
REFERÊNCIAS .....	51
DISCUSSÃO GERAL.....	56
CONCLUSÕES GERAIS.....	59
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS CAPÍTULO I.....	61
ANEXOS .....	72

DELFIOL, D.J.Z. Prevalência de Equinos Quarto de Milha Portadores das Mutações Causadoras da Miopatia por Acúmulo de Polissacarídeo Tipo I, Paralisia Periódica Hipercalêmica e Hipertermia Maligna no Brasil. Botucatu, 2014. 84 p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

## RESUMO

Entre as principais enfermidades genéticas identificadas nos equinos da raça Quarto de Milha (QM) estão a miopatia por acúmulo de polissacarídeo 1 (PSSM1), a paralisia periódica hipercalêmica (HYPP) e a hipertermia maligna (HM). No Brasil o teste molecular para a PSSM1 e para HM não está disponível e tampouco se conhece sobre a prevalência destas enfermidades, enquanto que, para HYPP apesar do teste estar disponível no país, informações sobre sua prevalência são escassas. O objetivo deste trabalho foi padronizar o teste para PSSM1, HYPP e HM e estudar a prevalência destas enfermidades em cavalos da raça QM no Brasil. Foram utilizados DNA sanguíneo de 741 cavalos. O teste genético para as três enfermidades foi padronizado e as amostras sequenciadas para identificação da mutação no gene *GYS1* responsável pela PSSM1, no gene *SCN4A* responsável pela HYPP e no gene *RYR1* responsável pela HM. A prevalência da PSSM1 foi de 6,7%, da HYPP de 4,2% e não foram encontrados animais com a mutação responsável pela HM. Os resultados alertam para a importância da PSSM1 e da HYPP nos cavalos QM no Brasil. A padronização dos testes será útil para o diagnóstico da PSSM1 e da HM. Identificar os animais positivos para PSSM1, HYPP e HM irá auxiliar na escolha dos acasalamentos e será importante para minimizar a ocorrência destas enfermidades.

Palavras chave: doença genética, *GYS1*, miopatia, *RYR1*, *SCN4A*.

DELFIOL, D.J.Z. Prevalence of Type 1 Polysaccharide Storage Myopathy, Hyperkalemic Periodic Paralysis and Malignant Hyperthermia in Quarter Horse carriers in Brazil. Botucatu, 2014. 84 p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

## **ABSTRACT**

Type 1 polysaccharide storage myopathy (PSSM1), hyperkalemic periodic paralysis (HYPP) and malignant hyperthermia (MH) are considered major genetic diseases identified in Quarter Horses (QH). In Brazil, the molecular test for PSSM1 and MH is not available and the prevalence of both diseases is not known. Regarding HYPP, information about the disease prevalence is limited, although a molecular test is available in the country. The aim of this study was to standardize a molecular test for PSSM1, HYPP and MH, as well as to evaluate the diseases' prevalence in Brazilian QM. Blood DNA from 741 horses were used and genetic tests for the three diseases were standardized. Samples were sequenced to identify the mutation on *GYS1* gene, responsible for the PSSM; on *SCN4A* gene, responsible for HYPP; and on *RYR1* gene, responsible for MH. The prevalence obtained was 6.7% for PSSM1, 4.2% for HYPP and no positive results were found for MH. The results indicate the importance of PSSM1 and HYPP in QM in Brazil. Tests standardization would be useful for the diagnosis of PSSM1 and MH. The identification of positive animals for PSSM1, HYPP and MH would assist on the mating selections and thus reduce the occurrence of these diseases.

Key words: genetic disease, *GYS1*, myopathy, *RYR1*, *SCN4A*.

## *CAPÍTULO I*

## *INTRODUÇÃO*

## 1. INTRODUÇÃO

O cavalo sempre desempenhou papel importante na vida do homem. Antigamente era utilizado principalmente como meio de transporte, para auxiliar em trabalhos agrícolas e como arma de guerra (VOGEL, 2011). Porém, em virtude do crescimento da indústria automobilística e da intensa mecanização agrícola ocorrida no último século, a criação de cavalos para tração tornou-se menos importante que outras atividades equestres. A procura por cavalos para lazer e principalmente, para práticas esportivas cresceu muito nas últimas décadas (MOTA et al., 2002).

Dentre as diversas raças de cavalos, a raça Quarto de Milha (QM) ocupa lugar de destaque, principalmente, devido à sua versatilidade, a qual viabilizou seu uso em diversas modalidades esportivas (HARRIS & SWINNEY 2010). A raça QM é dividida em três linhagens principais: conformação, velocidade (modalidades de corrida, tambor e baliza) e trabalho, sendo que esta última engloba animais das modalidades esportivas de rédeas e apartação. Estas modalidades esportivas são muito praticadas no Brasil com inúmeras competições durante o ano (ABQM, 2014). Algumas doenças genéticas ocorrem com maior frequência em determinadas linhagens, devido aos acasalamentos consanguíneos entre famílias que possuem os genes afetados (RUDOLPH et al., 1992; BROSNAHAN et al., 2010).

Investimentos na raça visando principalmente o melhoramento genético são cada vez maiores. Com o desenvolvimento das biotecnologias de reprodução, tendo como destaque a transferência de embriões, uma única égua pode produzir vários potros em uma mesma estação, com sêmen de garanhões de qualquer parte do mundo. Geralmente, esses cruzamentos são escolhidos baseados apenas no desempenho dos animais durante a vida esportiva ou em sua conformação. Sendo assim, talvez por desconhecimento ou pela dificuldade de diagnóstico, as doenças genéticas acabam sendo, por vezes, negligenciadas e o problema só passa a ser evidente no terço final de gestação, após a parição do potro ou até mesmo no momento da doma, quando nada mais pode ser feito para evitar o prejuízo econômico e o sofrimento dos animais.

Na raça QM, cinco importantes doenças genéticas possuem as mutações caracterizadas (TRYON et al., 2009), essas doenças são: a paralisia periódica hipercalêmica (HYPP) (RUDOLPH et al., 1992), deficiência da enzima ramificadora do glicogênio (GBED) (WARD et al., 2004), astenia dérmica regional hereditária equina (HERDA) (TRYON et al., 2007), miopatia por acúmulo de polissacarídeo 1 (PSSM1) (MCCUE et al., 2008a) e a hipertermia maligna (HM) (ALEMAN et al., 2009).

No Brasil, somente a HYPP (GARCIA et al., 1996) e a HERDA (BADIAL et al., 2014) possuem teste comercial disponível para confirmação da doença. O teste para GBED está sendo padronizado (ARAÚJO et al., 2014) e a PSSM1 e a HM ainda não possuem o diagnóstico molecular confirmatório padronizado no país.

A PSSM1 é uma enfermidade autossômica dominante, que ocorre devido a uma mutação pontual no gene *GYS1* (MCCUE et al., 2008a). Os principais sinais clínicos da PSSM1 são andar rígido, relutância em se movimentar, rigidez, fraqueza e dor muscular. Nos Estados Unidos da América (EUA), a prevalência da mutação em equinos QM é estimada entre 6,6% (MCCUE et al., 2010) e 11,3% (TRYON et al., 2009). A PSSM1 é considerada a principal causa de miopatia em equinos (MCCUE et al., 2010).

A HYPP é uma enfermidade autossômica co-dominante, decorrente de uma mutação pontual no gene *SCN4A*, que foi a primeira mutação genética identificada em equinos (RUDOLPH et al., 1992). Todos os animais positivos para a enfermidade possuem um ancestral em comum, o garanhão Impressive, muito utilizado na linhagem de conformação (NAYLOR et al., 1992a). Este garanhão teve aproximadamente 2.250 filhos e mais de 55.000 descendentes (NAYLOR, 1994a). Por este motivo a doença ficou conhecida nos EUA como “síndrome do Impressive” (MOORE, 1993; NAYLOR, 1994a).

Os sinais clínicos da HYPP são em forma de crises e incluem miotonia, fasciculações musculares, prolapso de terceira pálpebra, fraqueza muscular, dificuldade respiratória e decúbito (STEISS & NAYLOR, 1986; MEYER et al., 1999). Nos EUA a prevalência da enfermidade nos animais da linhagem de conformação é de aproximadamente 56% (TRYON et al., 2009).

A HM é uma doença genética autossômica dominante, que foi diagnosticada em equinos QM, após a ocorrência de hipertermia grave durante

a anestesia geral inalatória (ALEMAN et al., 2004; ALEMAN et al., 2005; FINNO et al., 2009). A enfermidade ocorre devido a uma mutação pontual no gene *RYR1* (ALEMAN et al., 2004). O principal sinal clínico identificado é hipertermia que pode ultrapassar os 43°C, outros sinais clínicos podem estar presentes como prolapso de terceira pálpebra, trismo mandibular (ALEMAN et al., 2009), sudorese intensa, rigidez muscular, rabdomiólise e incapacidade de permanecer em estação (DENBOROUGH, 1998; ALEMAN et al., 2005). A prevalência da HM nos EUA é de 1,3% (NIETO & ALEMAN, 2009).

Para melhor compreensão sobre a PSSM1, HYPP e HM uma revisão bibliográfica sobre essas enfermidades é apresentada neste capítulo.

Este trabalho teve como objetivo padronizar a técnica de PCR para PSSM1, HYPP e HM e determinar a prevalência das mutações responsáveis pelas três enfermidades nos cavalos QM no Brasil.

*REVISÃO DE LITERATURA*

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Miopatia por acúmulo de polissacarídeo (PSSM)

A PSSM é classificada em PSSM1 e PSSM2 (MCCUE et al., 2008b; MCCUE et al., 2009a; VALBERG et al., 2011). Apesar do objetivo deste trabalho ser o estudo da PSSM1 para melhor entendimento da enfermidade, nesta revisão será abordada os dois tipos de PSSM. Quando o termo PSSM for utilizado estará se referindo tanto a PSSM1 quanto a PSSM2.

#### 2.1.1 Etiologia

A PSSM1 é uma enfermidade autossômica dominante que ocorre devido a mutação pontual (c.926G>A) no gene responsável pela síntese de glicogênio 1 (*GYS1*) que acarreta a substituição de uma guanina por uma adenina resultando na troca de uma arginina por uma histidina, sendo caracterizada pelo acúmulo excessivo de glicogênio nas células musculares (MCCUE et al., 2008a). Cavalos que possuem PSSM por outras razões ainda desconhecidas são classificados como acometidos por PSSM2 (MCCUE et al., 2009a).

O armazenamento de glicogênio é essencial para a homeostase da glicose e para fornecer energia durante as atividades musculares (KOLLBERG et al., 2007) e o gene *GYS1* está relacionado com a síntese do glicogênio da musculatura cardíaca e esquelética (KOLLBERG et al., 2007, NAYLOR et al., 2012b). Em humanos a mutação neste gene provoca cardiomiopatia e intolerância ao exercício (KOLLBERG et al., 2007). Em equinos a mutação no gene *GYS1* afeta principalmente a musculatura esquelética (VALBERG et al., 1992; MCCUE et al., 2009a; NAYLOR et al., 2012b), podendo também ocorrer inclusão de polissacarídeo na musculatura cardíaca (VALENTINE et al., 1997; LARCHER et al., 2008).

MCCUE et al. (2009a) levantaram três possibilidades para a ausência da mutação no gene *GYS1* em alguns cavalos com diagnóstico de PSSM no exame histopatológico. A primeira e a menos provável é que a mutação descrita não seja a causa da PSSM; a segunda é que muitos casos diagnosticados pelo exame histopatológico sejam falsos positivos; a terceira é

a existência de duas formas de PSSM, inclusive existindo a possibilidade da PSSM2 ser causada por uma mutação em outro local ainda não identificado.

### 2.1.2 Epidemiologia

A PSSM não apresenta predileção por sexo ou idade (HUNT et al., 2008; McGOWAN et al., 2009). Em um trabalho realizado por FIRSHMAN et al. (2003), a média de idade em que os cavalos apresentaram sinais clínicos de rabdomiólise foi de  $4,9 \pm 3,5$  anos, e variou de 1 dia a 14 anos de vida. O diagnóstico histopatológico de PSSM já foi descrito em 35 raças de equinos e a mutação no gene *GYS1*, descrita em 17 raças (MCCUE et al., 2008b).

A PSSM2 já foi identificada nos EUA, (VALBERG et al., 1999; FIRSHMAN et al., 2005; MCCUE et al., 2006), Inglaterra (McGOWAN et al., 2009) e Dinamarca (Söderqvist et al., 2013), enquanto que a PSSM1 foi identificada nos EUA (MCCUE et al., 2008a; TRYON et al., 2009; MCCUE et al., 2010), Austria (SCHWARZ et al., 2011) e Inglaterra (STANLEY et al., 2009) sendo provável que a enfermidade ocorra em outros países. Um estudo realizado nos EUA com as raças de origem europeia, South German CB e a Saxon-Thuringian CB, houve prevalência de 20,4% e 11,4% de animais portadores da mutação no gene *GYS1*, respectivamente (MCCUE et al., 2010).

Na Inglaterra, McGOWAN et al. (2009) demonstraram por exame histopatológico que a PSSM é uma enfermidade comum em cavalos com miopatia, estando presente em 21% dos animais; neste estudo não realizou-se o teste molecular para diferenciar entre tipo 1 e 2. Nos EUA a maior prevalência de PSSM1 é na raça Pecheron, onde 62,4% dos animais amostrados eram positivos; no QM a prevalência variou entre 11,3% (TRYON et al., 2009) e 6,6% (MCCUE et al., 2010). Quando as avaliações foram feitas apenas pelo exame histopatológico, a ocorrência foi de 36% nas raças de tração (FIRSHMAN et al., 2005) e entre 6 e 12% no QM (MCCUE & VALBERG, 2007). Quando se considerou somente os equinos com sinais clínicos de rabdomiólise a prevalência no QM chegou a 48,5% (MCCUE et al., 2006). Na Dinamarca estimou-se através do exame histopatológico que a prevalência da PSSM seja de 1,7% (SÖDERQVIST et al., 2013).

### 2.1.3 Patogênese

Causas de armazenamento anormal de glicogênio como a deficiência de miofosforilase, deficiência da enzima fosfofrutoquinase, deficiência de adenosina monofosfato quinase e deficiência da enzima ramificadora de glicogênio que são descritas em outras espécies, sendo a última, também descrita em equinos (WARD et al., 2004), foram excluídas como causa de PSSM (VALBERG et al., 1998; VALBERG, 2006).

A musculatura esquelética é composta por três tipos de fibras, (I, II A e II X) que diferem entre si por suas características contráteis e metabólicas (RIVERO et al., 1996; HINCHCLIFF et al., 2013). As fibras tipo I, são de contração lenta, possuem mais mitocôndrias e utilizam o mecanismo oxidativo (aeróbico) para a formação de ATP. As fibras do tipo II são de contração rápida, sendo tanto a II A (oxidativo e glicolítico), quanto a tipo II X (glicolítico) fortemente dependentes do metabolismo do glicogênio para fornecer ATP (QUIROZ-ROTHER & RIVERO, 2001; NAYLOR et al., 2012b). Cavalos com PSSM1 acumulam glicogênio em excesso nas fibras musculares II A e II X, devido à mutação no gene *GYS1* responsável pela síntese de glicogênio. Este acúmulo faz com que ocorra lesão muscular após esforço (MCCUE et al., 2008a).

É provável que a PSSM seja causada por um defeito na via reguladora que controla o fluxo de substratos, como a glicose para dentro da célula muscular, ou pelo, o fluxo de glicogênio e ácidos graxos livres nas vias metabólicas durante exercícios aeróbicos (VALBERG, 2006).

A patogênese da PSSM ainda não está completamente desvendada. Uma das causas propostas é o aumento de sensibilidade à insulina (ANNANDALE et al., 2004; FIRSHMAN et al., 2005) associada ao consumo de dietas ricas em carboidratos, o que levaria à maior captação de glicose pela musculatura esquelética e subsequente formação de glicogênio (VALBERG, 2006).

### 2.1.4 Sinais clínicos

Equinos com PSSM podem ser assintomáticos (FIRSHMAN et al., 2005; MCCUE et al., 2008a) e nos animais em que a doença se manifesta, os sinais

clínicos podem variar em intensidade e incluem: rigidez muscular, sudorese, dor, relutância em se movimentar, fasciculações musculares, fraqueza e atrofia muscular, andar rígido, sinais de cólica, mioglobínúria e decúbito (VALBERG et al., 1999a; FIRSHMAN, 2003; ALEMAN, 2008; MCCUE et al., 2009a). Geralmente os animais acometidos apresentam mais de um sinal clínico (FIRSHMAN et al., 2003; VALBERG, 2006, VALBERG et al., 2011).

Estudos recentes demonstraram que na PSSM1 há dominância incompleta, ou seja, nos animais homocigotos a doença se manifesta de uma forma mais grave em comparação aos animais heterocigotos (NAYLOR et al., 2012a). Nos animais que possuem a PSSM1 associado à mutação no gene receptor da rianodina 1 (*RYR1*), que causa hipertermia maligna, os sinais clínicos são mais evidentes e potencialmente fatais (MCCUE et al., 2009b).

A PSSM pode ou não estar relacionada ao exercício (ALEMAN, 2008). Alguns equinos com PSSM, mesmo sendo bastante exigidos fisicamente, não apresentam clínica (VALBERG et al., 2011). Já outros cavalos podem apresentar sinais clínicos quando conduzidos ao passo, trote, galope ou até mesmo pastando, durante transportes ou após serem colocados em baias (FIRSHMAN et al., 2003). Poucos minutos de exercício já é suficiente para que alguns animais apresentem os sinais clínicos (FIRSHMAN et al., 2003, VALBERG et al., 2011). A razão pela qual existe essa variação fenotípica dos sinais clínicos entre os animais com PSSM não está claramente entendida (NAYLOR et al., 2012a).

Nos equinos homocigotos para a mutação, os sinais clínicos tendem a ser mais evidentes (NAYLOR et al., 2012a). Geralmente os sinais são desencadeados após alguns minutos de exercício constante, principalmente nos cavalos que estão há algum tempo sem se exercitarem (FIRSHMAN et al., 2003; VALBERG, 2006). Os sinais clínicos duram algumas horas e quando há dor muscular podem perdurar por até dois dias; em casos graves pode ocorrer morte (VALBERG et al., 1992).

### **2.1.5 Patologia clínica**

Equinos com PSSM apresentam aumento de atividade das enzimas creatina quinase (CK) (DE LA CORTE et al., 2002; NAYLOR et al., 2012a) e aspartato aminotransferase (AST) (SPRAYBERRY et al., 1998; MCCUE et al.,

2006; NAYLOR et al., 2012a). Os valores de referência para CK e AST em equinos é de 35 a 380 UI/L (RADOSTITS et al., 2007) e 226 a 336 UI/L (ORSINI & DIVERS 2007), respectivamente. Nos cavalos com PSSM os valores médios de CK são de 459 UI/L podendo chegar a mais de 35.000 UI/L durante os episódios agudos e, os valores médios de AST são de 537 UI/L (VALBERG et al., 2011).

VALBERG et al. (1999a) demonstraram que em equinos QM portadores de PSSM os níveis da CK são maiores antes e após o exercício, em relação a cavalos da mesma raça que não apresentam a enfermidade. Nos equinos que possuem a mutação no gene *GYS1* os níveis de CK e AST, além de serem estatisticamente maiores em relação aos equinos que não possuem PSSM, ainda são estatisticamente superiores nos equinos homozigotos, em relação aos heterozigotos para a mutação (NAYLOR et al., 2012a).

A concentração de alguns metabólitos na musculatura de equinos como o glicogênio (FIRSHMAN et al., 2008), lactato e glicose-6-fosfato são estatisticamente maiores nos animais com PSSM, em relação aos animais controle, antes e após o exercício (VALBERG et al., 1999a). Os níveis plasmáticos da vitamina E, apesar de ficarem dentro do limite de referência para a espécie, são menores nos animais com a enfermidade quando comparados aos animais controle (NAYLOR et al., 2012a). Em alguns animais é possível identificar mioglobínúria durante episódios agudos de PSSM desencadeada por exercício (MACLEAY, 2004, VALBERG et al., 2011).

### **2.1.6 Diagnóstico**

Para que se estabeleça o diagnóstico da PSSM é necessário que haja uma suspeita, portanto todos os cavalos que apresentarem rigidez muscular, relutância em se movimentar, andar rígido e outros sinais de miopatia o diagnóstico de PSSM deve ser considerado (VALBERG et al., 1992; LARCHER et al., 2008; VALBERG et al., 2011).

O diagnóstico é fundamentado no histórico de episódios recorrentes de miopatia, nos sinais clínicos, aumento nos valores séricos de CK e AST, e associado ao exame histopatológico de biopsia muscular e do teste genético para PSSM1 (VALBERG et al., 1992; MCCUE et al., 2008a; NAYLOR et al., 2012).

Os músculos *semitendinosus*, *semimembranosus* ou o *gluteus medius* são os de escolha para biopsia, nos casos de suspeita de PSSM (VALENTINE et al., 1998; DE LA CORTE et al., 2002). Um fragmento com 2 x 1 cm de tamanho é o suficiente para análise; a biopsia pode ser colhida através de procedimento cirúrgico aberto ou utilizando uma agulha de biopsia muscular tipo Bergström (VALBERG et al., 2006). A melhor forma de conservar a amostra é congelando-a em nitrogênio líquido. A fixação em formol apesar de prática pode provocar a contração de até 30% as fibras musculares o que pode inviabilizar o diagnóstico (FIRSHMAN et al., 2006).

Além da coloração de rotina com hematoxilina e eosina (H&E) deve-se utilizar a coloração ácido periódico de Schiff e PAS-amilase para o diagnóstico (VALENTINE et al., 1998; DE LA CORTE et al., 2002; HUNT et al., 2008).

As amostras positivas para PSSM são caracterizadas pela inclusão PAS positivas nas fibras musculares tipo 2A e 2B que são resistentes à digestão da amilase (VALBERG et al., 1992; FIRSHMAN et al., 2006). É importante lembrar que o acúmulo de polissacarídeo amilase resistente não é evidente em equinos com menos de 18 meses de idade, dificultando o diagnóstico histopatológico nos animais dentro desta faixa etária (FIRSHMAN et al., 2006).

Alguns autores classificam a PSSM em grau 1, quando são identificados agregados granulares de polissacarídeo no citoplasma ou sob o sarcolema e, esses agregados são sensíveis á digestão da amilase; e em grau 2, quando as fibras musculares são PAS positivas e há inclusões cristalinas anormais, resistentes a digestão da amilase (MCCUE et al., 2006). Esta classificação aumenta a sensibilidade, mas diminui a especificidade do exame histológico (FIRSHMAN et al., 2006).

O teste genético (PCR) é realizado identificando a mutação no gene *GYS1*, sendo considerado o padrão ouro para o diagnóstico da PSSM1 (MCCUE et al., 2008a). MCCUE et al. (2009a) sugerem que nos animais suspeitos para PSSM e negativos no teste genético, deve ser feita a biopsia muscular para realização do exame histopatológico.

### **2.1.7 Diagnóstico diferencial**

A PSSM é um importante diagnóstico diferencial para todos os casos de anormalidades de locomoção, atrofia muscular e miopatia pós-exercício em

equinos (MCCUE et al., 2006), incluindo deficiência de vitamina E e selênio (VALBERG et al., 1992; AMORIM et al., 2011), hipertermia maligna (VALBERG et al., 1992; MCCUE et al., 2009b) e miopatia atípica (VOTION, 2012).

A doença do neurônio motor em equinos (DNM) é outro diagnóstico diferencial que deve ser considerado, pois as manifestações clínicas são semelhantes, porém na DNM as fibras musculares envolvidas são do tipo 1, enquanto na PSSM são as do tipo 2 (VALENTINE et al., 1998). VALENTINE et al. (1997) também incluem como diagnóstico diferencial da PSSM a miopatia pós anestésica e a mieloencefalopatia protozoária equina.

### **2.1.8 Prognóstico**

A enfermidade não tem cura, os equinos com PSSM sempre estarão predispostos a apresentar sinais clínicos, porém estes sinais podem ser controlados com manejo e alimentação adequada (FIRSHMAN et al., 2003, VALBERG et al., 2011). Animais que apresentam episódios recorrentes e com sinais clínicos graves tem o prognóstico desfavorável quanto ao desempenho atlético (MACLEAY, 2004).

### **2.1.9 Tratamento**

A PSSM não possui tratamento específico, sendo realizado apenas tratamento de suporte, que incluem fluidoterapia com correção do equilíbrio ácido básico e eletrolítico (MACLEAY, 2004), administração de antiinflamatórios não esteroidais (AINES) (flunixin meglumine, fenilbutazona ou dipirona), relaxantes musculares, sedativos e suplementação com vitamina E e selênio (FIRSHMAN et al., 2003).

É preciso ter cautela com o uso de AINES nos casos onde existe a suspeita de comprometimento renal (MACLEAY, 2004). Dietas especiais e exercícios programados são as melhores ferramentas para a redução dos sinais clínicos nos cavalos acometidos (VALENTINE et al., 2001; VALBERG et al., 2011).

### **2.1.10 Manejo da dieta e programa de exercícios**

A modificação na dieta para cavalos com PSSM é baseada na redução do fornecimento de carboidrato e aumento na quantidade de gordura

(VALBERG, 2006; VALBERG et al., 2011). Estas recomendações são fundamentadas na suspeita do envolvimento de um defeito no metabolismo dos carboidratos que pode resultar no acúmulo de glicogênio nos tecidos (VALENTINE et al., 2001a).

As forragens contêm carboidratos estruturais (CE) que nos equinos são fermentados pelos microorganismos do intestino grosso, dando origem a ácidos graxos voláteis, principalmente acético e butirico que podem ser transformados em energia ou utilizados na síntese de gordura. O açúcar e o amido são carboidratos não estruturais (CNE) que são absorvidos no intestino delgado, predominantemente como forma de glicose, tendo um efeito hiperglicêmico, que pode desencadear os sinais clínicos da PSSM (VALENTINE et al., 2001a).

É recomendado que os animais consumam ao menos 1% do peso vivo em forragem por dia (VALENTINE et al., 2001a). O ideal é que seja utilizado feno de gramínea ou aveia, se o feno for de má qualidade pode ser fornecido feno de alfafa, desde que não ultrapasse 50% do total de forragem consumida dia (FIRSHMAN et al., 2003).

O concentrado que contenha CNE, como também o melaço, devem ser retirados da dieta. Energia suplementar pode ser fornecida através de aveia peletizada com óleo de milho (até 600 mL/dia) ou farelo de arroz (0,5 kg/dia para animais que fazem exercícios leves podendo chegar a 2 kg/dia para animais que são mais exigidos fisicamente) (VALENTINE et al., 2001a; FIRSHMAN et al., 2003). Estudos demonstraram que há pouca elevação de glicose e insulina sistêmica após o consumo de farelo de arroz, apesar de este cereal ter aproximadamente 22% de CNE em sua composição (VALENTINE et al., 2001a). No farelo de arroz a relação cálcio:fósforo é em média 0,04:1,85, portanto, torna-se necessário suplementação mineral para equilibrar esta relação (VALENTINE et al., 2001a).

O objetivo da dieta é fornecer menos de 10% de energia digestível a base de CNE (amido e açúcar) e entre 15 e 20% de energia digestível a base de gordura (FIRSHMAN et al., 2003). Diminuindo os CNE da dieta e aumentando a gordura, RIBEIRO et al. (2004), conseguiram manter a concentração da atividade da CK dentro dos valores de referência para a espécie. VALENTINE et al. (2001a) observaram que em 93% (84/90) dos

cavalos que tiveram suas dietas modificadas houve controle dos sinais clínicos de PSSM após quatro meses de consumo.

Segundo VALBERG, (2010) há uma grande variedade nas necessidades individuais para a suplementação com gordura e esta deve ser equilibrada com o peso do cavalo. Cavalos com PSSM podem consumir menos gordura do que a recomendada por FIRSHMAN et al. (2003) e RIBEIRO et al. (2004) e apresentarem valores de CK normais (BORGIA et al., 2010). Nos EUA rações comerciais com baixa quantidade de amido e maior teor de gordura estão disponíveis no mercado e facilitam o manejo (BORGIA et al., 2010; VALBERG, 2010). O importante é avaliar cada caso individualmente e em algumas situações, uma alimentação a base de gramínea e suplementação adequada de vitaminas e minerais é o suficiente para o manejo dos cavalos (VALBERG, 2010).

Mudanças na dieta devem ser acompanhadas de um programa regular de exercícios (VALBERG et al., 2011). É recomendado que equinos com PSSM fiquem o menor tempo possível em baias, o livre acesso ao pastejo contínuo pode diminuir os picos pós prandial de glicose e insulina, e melhorar o metabolismo da glicose na musculatura esquelética, principalmente devido ao exercício e aumento do metabolismo oxidativo (DE LA CORTE et al., 2002).

FIRSHMAN et al. (2003) recomendam que duas semanas após a mudança da dieta os cavalos sejam exercitados diariamente, começando com trote em círculos durante cinco minutos e, que este tempo seja aumentado gradativamente, em 2 minutos por dia. Caso seja observada rigidez muscular, o aumento do tempo deve ser realizado de forma mais lenta. Quando os animais estiverem conseguindo trotar 15 minutos, deve ser dado um intervalo de descanso de 5 minutos e iniciar gradativamente uma nova bateria de exercícios graduais, até atingir 30 minutos de trote diário. A partir daí a equitação pode ser iniciada.

## 2.2 Paralisia periódica hipercalêmica (HYPP)

### 2.2.1 Etiologia

A HYPP é uma doença autossômica co-dominante que ocorre devido à uma mutação no cromossomo 11, que provoca a substituição de uma citosina por uma guanina no gene *SCN4A* do canal de sódio, que leva à substituição de uma fenilalanina por uma leucina (RUDOLPH et al., 1992).

### 2.2.2 Epidemiologia

A HYPP está descrita nas raças QM, Apallosa e na Paint Horse, sendo que as duas últimas, possuem a raça QM em sua composição, por ser uma mutação co-dominante, cavalos mestiços destas raças também podem ser acometidos (FINNO et al., 2009). A enfermidade não tem predisposição por sexo ou idade (NAYLOR et al., 1992). A mutação afeta principalmente animais de conformação, mas também foi encontrada em QM das linhagens de trabalho e velocidade (TRYON et al., 2009).

Todos os animais portadores da mutação responsável pela HYPP possuem um ancestral em comum, o garanhão Impressive, muito utilizado na linhagem de conformação e que teve aproximadamente 2.250 filhos (NAYLOR et al., 1992a; NAYLOR, 1994a). Por este motivo a doença ficou conhecida nos EUA como “síndrome do Impressive” (MOORE, 1993; NAYLOR, 1994a).

Os equinos com HYPP possuem a musculatura bem desenvolvida, provavelmente devido ao aumento da contração muscular que pode levar a hipertrofia (NAYLOR, 1994a), essa característica é desejada em animais de conformação, o que promoveu a propagação da mutação (NAYLOR, 1994b, SPIER, 2006).

Em 1996, BOWLING et al. descreveram que a prevalência da HYPP nos EUA era de 4%. Em um estudo realizado por TRYON et al. (2009), 1,5% dos QM e 4,5% dos cavalos Paint Horse possuíam a mutação, quando considerada somente a linhagem de conformação a prevalência foi de 56,4%. No Brasil ZORDAN (2000) ao testar 182 cavalos da raça QM para HYPP encontrou quatro animais (2,2%) heterozigotos. No México a prevalência é estimada em 15,7% (RIOJAS-VALDÉS et al., 2014).

### 2.2.3 Patogênese

Os canais de sódio controlam a contração das fibras musculares. Em animais normais esses canais se abrem para permitir uma rápida despolarização da membrana, na fase inicial do potencial de ação e se fecham quando a membrana é despolarizada (HOFFMAN et al., 1995; FONTAINE et al., 1997).

Nos animais com a mutação no gene *SCN4A* os canais de sódio permanecem abertos afetando transporte de íons na membrana das células musculares esqueléticas aumentando a permeabilidade do sódio e dificultando a repolarização (RUDOLPH et al., 1992; NAYLOR, 1994a). Ocorre também o aumento do potássio sérico que leva a nova despolarização (LEHMANN-HORN et al., 1987). Este mecanismo torna os músculos excessivamente excitáveis e com contrações involuntárias, resultando em fraqueza muscular e hipercalemia (LEHMANN-HORN et al., 1987; NAYLOR, 1994a).

### 2.2.4 Sinais Clínicos

Os animais acometidos geralmente apresentam sinais clínicos antes de atingirem três anos de idade (NAYLOR et al., 1993). Algumas situações estressantes como: o transporte, participação em exposições, jejum prolongado (PICKAR et al., 1991, NAYLOR et al., 1993; SPIER, 2006) e baixas temperaturas, podem desencadear as crises de HYPP em equinos (PICKAR et al., 1991; NAYLOR, 1994). A ingestão de feno de alfafa que é rico em potássio também tem sido associada à manifestação dos sinais clínicos (STEISS & NAYLOR, 1986; NAYLOR et al., 1992).

Os cavalos com uma cópia do alelo mutado (N/H) podem ser assintomáticos ou apresentarem crises diárias (MEYER et al., 1999); animais que são homocigotos para a mutação (H/H) apresentam sinais clínicos mais graves (RUDOLPH et al., 1992). Os sinais clínicos incluem miotonia, fasciculações musculares, prolapso de terceira pálpebra, fraqueza muscular, dificuldade respiratória e decúbito (STEISS & NAYLOR, 1986; MEYER et al., 1999). Ocasionalmente pode ocorrer morte súbita durante uma crise, principalmente devido à insuficiência cardíaca e paralisia dos músculos respiratórios (COX & DEBOWES, 1991).

Animais H/H podem apresentar também disfagia, hemiplegia laríngea e obstrução respiratória (NAYLOR et al., 1993; MEYER et al., 1999). A duração dos episódios geralmente é curta (20 minutos a 4 horas, tipicamente de 30 minutos a 1 hora) (NAYLOR et al., 1993, HARRIS & MAYHEW, 2000).

As primeiras descrições da HYPP indicavam que a fraqueza muscular e o decúbito eram sinais clínicos comuns durante as crises (COX, 1985; STEISS & NAYLOR, 1986), daí originou-se o termo paralisia para designar a enfermidade (NAYLOR, 1994a). Porém, um estudo experimental demonstrou que esses sinais são os mais graves e não os mais comuns (NAYLOR et al., 1993).

### **2.2.5 Patologia Clínica**

A principal alteração sérica que pode ser identificada nos equinos com HYPP é a elevação dos níveis de potássio, porém esta elevação apesar de frequente nem sempre está presente (NAYLOR et al., 1993). Os valores de referência para o potássio sérico em equinos é de 2,4 a 4,7 mmol/l (ORSINI & DIVERS 2007), durante as crises de HYPP geralmente estes valores estão entre 6,0 e 8,0 mmol/l (NAYLOR et al., 1993). Valores ainda maiores podem ser encontrados em alguns cavalos, entre as crises os níveis de potássio sérico estão em níveis considerados normais (NAYLOR et al., 1993; STEELE & NAYLOR, 1996).

Após a realização de exercícios, cavalos com HYPP apresentam níveis de lactato plasmático maiores que animais sem a enfermidade (STEELE & NAYLOR, 1996). Embora o equilíbrio ácido básico se mantenha normal, hemoconcentração e moderada hiponatremia podem ocorrer durante os episódios de crise (SPIER et al., 1993; SPIER, 2006).

### **2.2.6 Diagnóstico**

Animais com os sinais clínicos descritos anteriormente e descendentes do garanhão Impressive são sugestivos de serem portadores de HYPP (SPIER, 2006). Entre um episódio e outro os equinos parecem estar clinicamente normais (COX, 1985). O diagnóstico definitivo é realizado pelo teste genético para a identificação da mutação no gene *SCN4A* (RUDOLPH et al., 1992).

O teste do desafio do cloreto de potássio (KCL) (NAYLOR et al., 1993; STEELE & NAYLOR, 1996), era utilizado para o diagnóstico de HYPP (SPIER, 2006). Para a realização do teste após 12 horas de jejum o cavalo recebia por via oral a dose de 0,1g/kg de peso vivo (PV) de KCl, os animais eram monitorados durante seis horas após a administração. Os cavalos que apresentavam sinais clínicos da enfermidade eram considerados positivos para HYPP. Para ser considerado negativo o equino que não apresentasse sinais clínicos com a dose de KCL inicial deveria ser testado acrescentando 0,025g/kg/PV à dose inicial em testes sucessivos, até atingir 0,2g/kg/PV de KCl e não apresentar sinais clínicos (NAYLOR et al., 1993). O problema deste teste é que equinos portadores de HYPP podem morrer durante o desafio (NAYLOR, 1994a). Depois da descoberta da mutação, este teste não é mais necessário, portanto não deve ser realizado (LOHMANN, 2008).

A eletromiografia também foi utilizada para identificar equinos com HYPP, os animais portadores da mutação apresentam potenciais de ação anormais, complexo de descargas repetitivas com ocasionais potenciais miotônicos, mesmo que o cavalo não esteja em crise (ROBINSON et al., 1990).

### **2.2.7 Diagnóstico diferencial**

No diagnóstico diferencial devem ser consideradas outras causas de colapso, incluindo síncope, narcolepsia e convulsões (HARRYS & MAYHEW, 2000). A síndrome cólica, laminite, tétano e outras miopatias que possam levar a tremor muscular e decúbito também são diagnósticos diferenciais para HYPP (RUDOLPH et al., 1992; FINNO et al., 2009).

### **2.2.8 Prognóstico**

O prognóstico quanto à vida é favorável (COX, 1985), sendo na maioria dos casos uma doença controlável, no entanto episódios recorrentes podem acontecer e dependendo da intensidade dos sinais clínicos podem ser fatais (SPIER, 2006). É recomendado que animais com a mutação sejam manipulados e utilizados por pessoas que conheçam os sinais clínicos, e tenham cautela com o surgimento de qualquer indício de crise (HARRIS & MAYHEW, 2000).

### **2.2.9 Tratamento**

Se o cavalo estiver iniciando com sinais clínicos discretos (fasciculações musculares), exercícios leves podem interromper o episódio (SPIER, 2006). Em muitos animais com crises brandas e esporádicas não é necessário tratamento (NAYLOR et al., 1994a).

Quando o equino apresenta crises graves é recomendada a administração intravenosa de gluconato de cálcio (0,2 a 0,5 ml/kg de PV de solução a 23% de gluconato de cálcio em um litro de dextrose a 5%), o aumento da concentração do cálcio extracelular, aumenta o limiar do potencial da membrana muscular o que diminui sua excitabilidade (STEISS & NAYLOR 1986, SPIER, 2006).

No início das crises pode ser administrado 60 ml de xarope de milho, que é rico em dextrose, por via oral (CAUDILL, 2014). O fornecimento de dextrose estimula a circulação do potássio mediada por insulina para o interior das células, reduzindo os valores séricos deste eletrólito (SPIER, 2006). Alguns autores recomendam a administração de adrenalina (3ml de solução 1:1000 pela via intramuscular para um cavalo de 500kg) (SPIER, 2006; LOHMANN, 2008), por ela estimular a bomba de sódio e potássio aumentando a absorção intracelular de potássio e a eliminação do sódio (MEYER, 1999).

Os animais portadores da doença devem ingerir dieta balanceada com baixo teor de potássio (NAYLOR et al., 1993, SPIER, 2006) e pode ser necessária à administração de diuréticos como a acetazolamida (3mg/kg/VO), que promove a excreção seletiva do potássio e aumenta a liberação de insulina, facilitando a entrada do potássio para dentro das células (NAYLOR, 1994a).

### **2.2.10 Prevenção e controle**

Para evitar os episódios de HYPP a principal medida é diminuir o teor de potássio da alimentação (concentração entre 0,6% e 1,5% da dieta) e aumentar sua excreção renal (SPIER, 2006). O feno de alfafa não deve ser fornecido, pois é rico em potássio, o ideal é a alimentação com gramíneas (LOHMANN, 2008). O uso da acetazolamida por via oral a cada 8 ou 12 horas tem sido recomendado para os cavalos que continuam apresentando crises mesmo consumindo níveis adequados de potássio (SPIER, 2006).

Como medida preventiva, assim como ocorre nos EUA (MEYER et al., 1999), a ABQM impôs algumas restrições para o registro de animais descendentes do Impressive. A partir de primeiro de julho de 2004 o teste tornou-se obrigatório para os animais descendentes do garanhão, sendo o resultado do exame anotado no registro do cavalo e desde primeiro de julho de 2007 está proibido o registro de animais homozigotos para HYPP (ABQM, 2014).

## **2.3 Hipertermia maligna**

### **2.3.1 Etiologia**

A hipertermia maligna (HM) é uma doença genética autossômica dominante, que foi diagnosticada em equinos QM, após a ocorrência de hipertermia grave durante a anestesia inalatória (ALEMAN et al., 2004; ALEMAN et al., 2005; FINNO et al., 2009). Os equinos acometidos possuem uma mutação pontual caracterizada pela substituição de uma citosina por uma guanina na posição 7.360 da região codificante, no exón 46 (c.7360C>G), do gene receptor da riodina (*RYR1*) (ALEMAN et al., 2009).

### **2.3.2 Epidemiologia**

Não há predisposição por sexo ou idade na HM (HILDEBRAND & HOWITT, 1983; ALEMAN et al., 2005). Pode ser desencadeada por anestésicos halogenados e relaxante muscular despolarizante (succinilcolina) (DENBOROUGH, 1998). Situações de estresse como transporte, início da doma, dias muito quentes, dor e episódios recorrentes de rabdomiólise induzida ou não por exercício também podem desencadear a HM (ALEMAN et al., 2009).

Em um estudo realizado em 225 cavalos da raça QM nos Estados Unidos da América (EUA) selecionados aleatoriamente, a mutação foi encontrada em três equinos (1,3%), sendo todos os animais heterozigotos (NIETO & ALEMAN, 2009). A HM é mais frequente em QM da linhagem de conformação (ALEMAN et al., 2009), além da raça QM, a HM também já foi identificada em animais das raças Puro Sangue Inglês, Appaloosa, Árabe e em Pôneis (ALEMAN et al., 2005). Por se tratar de uma doença autossômica

dominante, raças que possuam o QM em sua composição, como o Paint Horse, também podem apresentar a doença (ALEMAN et al., 2009).

A HM já foi descrita em humanos (MCCARTHY et al., 1990), suínos (FUJII et al., 1991), cães (O'BRIEN et al., 1984; Roberts et al., 2001), veados (PERTZ & SUNBERG, 1978) e equinos (KLEIN, 1975 apud ALEMAN et al., 2009; ALEMAN et al., 2004; ALEMAN et al., 2005). No Brasil, a doença já foi identificada em humanos (MCWILLIAMS et al., 2002) e suínos (CARMO et al., 2010), em equinos não foi encontrada nenhuma descrição da doença na literatura nacional compilada. A HM é uma doença potencialmente fatal em cavalos com uma taxa estimada de 34% de letalidade (ALEMAN et al., 2009).

### **2.3.3 Patogênese**

A riodina é um receptor do canal de liberação de cálcio do retículo sarcoplasmático da musculatura esquelética (MCCARTHY et al., 2000). A disfunção deste receptor devido à mutação no gene *RYR1* resulta em uma liberação excessiva de cálcio no mioplasma (ALEMAN et al., 2004), desencadeando uma sequência de eventos que levam a um estado hipermetabólico aumentando a termogênese e por último, levando à morte celular (O'BRIEN et al., 1984; DENBOROUGH, 1998).

### **2.3.4 Sinais clínicos**

Os sinais clínicos incluem taquicardia, taquipnéia, hipertermia, que pode exceder 43°C, prolapso de terceira pálpebra, trismo mandibular (ALEMAN et al., 2009), sudorese intensa, rigidez muscular, rabdomiólise, incapacidade de permanecer em estação (DENBOROUGH, 1998; ALEMAN et al., 2005; UENO et al., 2005) e mioglobinúria (ALEMAN, 2008; ALEMAN et al., 2009). Em estudo realizado por ALEMAN et al. (2009b), quatro animais tiveram morte súbita algumas horas após desenvolverem sinais de rabdomiólise e apresentavam a mutação descrita no gene *RYR1*. Estes casos não estavam associados com procedimentos anestésicos.

Quadros clínicos mais graves de rabdomiólise, foram observados em cavalos que possuíam a mutação no gene *RYR1* associada à mutação, no gene *GYS1*, responsável pela miopatia por acúmulo de polissacarídeo 1 (PSSM1) (MCCUE et al., 2009b). Além disso, os episódios de rabdomiólise são

mais frequentes em animais que apresentem as duas mutações. Sendo assim, é interessante que em animais com PSSM1 se verifique se há também a mutação no gene *RYR1* (ALEMAN et al., 2009; MCCUE et al., 2009b).

### **2.3.5 Patologia clínica**

O principal achado laboratorial nos cavalos com HM é o aumento sérico das enzimas musculares CK e AST (GRINT et al., 2007; ALEMAN et al., 2009). Estas enzimas podem não estar aumentadas nos casos de morte súbita (ALEMAN, 2008). No exame hemogasométrico se observa acidose metabólica e respiratória (UENO et al., 2005; ALEMAN et al., 2009).

Outras alterações incluem azotemia, aumento do hematócrito, leucocitose por neutrofilia (UENO et al., 2005; ALEMAN et al., 2009), e desequilíbrios eletrolíticos (hiponatremia, hipercalemia, hipocloremia, hipocalcemia ou hipercalemia, hiperfosfatemia, hiperglicemia, hiperlactatemia) (ALEMAN et al., 2009).

### **2.3.6 Diagnóstico**

O diagnóstico clínico da HM é realizado quando ocorre hipertermia rápida e progressiva, hipercapnia e acidose, durante a anestesia geral inalatória (ALEMAN et al., 2005). Durante a anestesia geral o equino tende a perder calor, principalmente devido à diminuição do metabolismo, imobilidade e pela evaporação (transpiração e respiração). A temperatura corporal pode subir quando a temperatura ambiente for muito alta ou quando se utiliza circuito inalatório fechado (HARVEY, 2006). Um rápido e descontrolado aumento da temperatura corporal durante a anestesia é indicativo de um processo patológico, sendo a HM um dos principais (GRINT et al., 2007).

O padrão ouro para o diagnóstico da HM é o teste genético para a identificação da mutação do gene *RYR1* (ALEMAN et al., 2005; NIETO & ALEMAN, 2009). O teste pode ser realizado por PCR (ALEMAN et al., 2004) ou por PCR em tempo real (qPCR) (NIETO & ALEMAN, 2009), sendo que a vantagem da realização do qPCR é a rapidez do resultado, o que permite que o teste seja realizado antes do procedimento anestésico (NIETO & ALEMAN, 2009).

Em humanos o teste genético isolado para diagnóstico de HM nem sempre é recomendado, uma vez que nesta espécie a mutação pode estar localizada em seis diferentes pontos (MACLENNAN, 1992). O teste utilizado para o diagnóstico da HM, em humanos, é o de contração muscular in vitro (LARACH et al., 1989), onde observa-se a diferença de contratilidade do músculo, utilizando cafeína e halotano (HOPKINS et al., 1994), porém, podem ocorrer resultados falso positivos (HOPKINS, 2000). Em equinos a mutação pontual torna o teste genético mais adequado (NIETO & ALEMAN, 2009).

### **2.3.7 Diagnóstico diferencial**

Enfermidades musculares como a HYPP (RUDOLPH et al., 1992), PSSM (VALBERG et al., 1992), miopatia pós anestésica (KLEIN et al., 1989; GRINT et al., 2007), miopatia por esforço (FOREMAN, 1998) ou qualquer outra causa de miopatia relacionadas ou não ao exercício, devem ser consideradas como diagnóstico diferencial para HM (ALEMAN, 2008).

Durante a anestesia o principal sinal clínico apresentado é aumento de temperatura. Nestas situações devem ser levadas em consideração outras causas de hipertermia, como temperatura ambiente muito alta ou a utilização de circuito inalatório fechado, porém essas causas são pouco comuns e dificilmente elevariam a temperatura próximo de 43°C como ocorre na HM (HARVEY, 2006; GRINT et al., 2007).

### **2.3.8 Prognóstico**

Para os animais que apresentarem sinais clínicos de HM, o prognóstico é de reservado a desfavorável, levando em consideração a taxa de 34% de letalidade (ALEMAN et al., 2009). O tratamento adequado durante a manifestação dos sinais clínicos aumenta a chance de sobrevivência dos equinos e, após a recuperação do episódio, os animais poderão voltar às suas atividades normais e terão uma qualidade de vida normal (CARPENTER, 2006).

### **2.3.8 Tratamento**

A doença não possui tratamento específico, sendo este somente de suporte (ALEMAN et al., 2005). O passo mais importante no tratamento da HM

é retirar os fatores que desencadeiam a crise; nos casos de anestesia inalatória o procedimento deve ser suspenso (CARPENTER, 2006).

O dantrolene sódico age como relaxante muscular e como antagonista do cálcio intracelular (KLEIN, 1990), sendo considerado na espécie humana como o único tratamento específico para HM (HOPKINS, 2000; TOBIN, 2001). O medicamento tem sido recomendado para equinos na dosagem de 2 a 3 mg/kg/IV durante as crises de HM, porém, tem um alto custo e está disponível em poucos hospitais veterinários (CARPENTER, 2006).

Para o controle da hipertermia é recomendado o uso de gelo, água gelada ou álcool na superfície corporal próximo aos grandes vasos sanguíneos. Fluidoterapia e enema com soluções geladas também podem ser utilizados (KLEIN, 1990; CARPENTER, 2006; GRINT et al., 2007).

## **2.4 Considerações gerais**

A PSSM é uma das principais causas de miopatia em equinos, sendo um diagnóstico diferencial importante nos casos de rabdomiólise, anormalidades de locomoção e atrofia muscular. A real causa da PSSM2 ainda precisa ser identificada. Uma alimentação balanceada e programas de exercício diários são necessários para o manejo dos equinos com PSSM e, mesmo realizando todas as recomendações, o desempenho atlético desses animais estará comprometido.

A HYPP apesar de ter sido a primeira enfermidade genética identificada nos equinos e da adoção de medidas de controle pelas associações, ela ainda possui alta prevalência. Isso se deve principalmente ao sucesso dos animais positivos nas competições em que participam.

A HM é uma doença genética com baixa prevalência em equinos, mas é potencialmente fatal, sendo interessante a realização do teste genético nos animais que apresentarem sinais clínicos frequente de rabdomiólise, aumento de CK e AST sem causa aparente e naqueles que apresentarem hipertermia, miosite ou morte súbita, durante ou após a anestesia inalatória.

A única maneira de evitar a transmissão da mutação responsável pela PSSM1, HYPP e HM é retirando os equinos com as enfermidades da reprodução. Para que isso ocorra é necessária à conscientização de criadores

e médicos veterinários sobre a importância clínica e econômica destas mutações.

## *CAPÍTULO II*

O artigo a seguir foi redigido em conformidade com as normas do periódico científico “Pesquisa Veterinária Brasileira”.

**Prevalência da mutação causadora da miopatia por acúmulo de polissacarídeo tipo 1 em cavalos Quarto de Milha no Brasil**

(Prevalence of the type 1 polysaccharide storage myopathy mutation in Quarter Horses in Brazil)

**Abstract**

Type 1 polysaccharide storage myopathy (PSSM1) is a dominant autosomal genetic disease caused by a point mutation in the *GYS1* gene. Although PSSM1 has been described as one of the major causes of myopathy in horses in other countries, there are no studies describing the prevalence of such mutation responsible for the development of PSSM1 in Brazil. The aim of this study was to determine the prevalence of the mutation responsible for the PSSM1 in Quarter Horses in Brazil. Blood samples from 741 horses were used for DNA extraction, which belonged to Quarter Horses from different equestrian modalities such as cutting, reining, barrel racing, racing and halter. A molecular test was standardized to identify the mutation, using oligonucleotide primers designed from an equine *GYS1* gene sequence stored in GenBank™. From the 741 animals evaluated, 6.7% (50/741) showed the mutation, considering that 6.6% (49/741) and 0.1% (1/741) of these animals were heterozygotes and homozygotes, respectively. The greater prevalence 31.7%, (32/101) was observed in animals from the halter lineage. The mutation was not found in the racing lineage. There was no significant difference on the mutation prevalence between males and females. In addition, the mutation responsible for the PSSM1 was found in 48.8% of the farms where samples were obtained. The PSSM1 prevalence observed here indicates the relevance of the disease, which must be considered as a differential diagnosis for myopathy, and also indicates the importance of performing horse breeding orientations.

INDEX-TERMS: PSSM1; *GYS1* gene; genetic disease; myopathy; horses.

## Resumo

A miopatia por acúmulo de polissacarídeo 1 (PSSM1) é uma doença genética autossômica dominante que ocorre devido à mutação pontual no gene *GYS1*. Apesar da PSSM1 ser descrita em outros países como uma das principais causas de miopatia em equinos, no Brasil não existem estudos sobre a prevalência da mutação causadora de PSSM1. O objetivo deste trabalho foi determinar a prevalência da mutação responsável pela PSSM1 em cavalos da raça Quarto de Milha (QM) no Brasil. Foram utilizadas amostras de sangue de 741 cavalos QM para extração de DNA, os quais eram utilizados nas modalidades esportivas de rédeas, apartação, tambor e baliza, corrida e conformação. Um teste molecular foi padronizado para identificar a mutação, utilizando oligonucleotídeos iniciadores desenhados a partir da sequência do gene *GYS1* equino depositadas no GenBank™. Dos 741 animais utilizados 6,7% (50/741) apresentavam a mutação, sendo que, destes cavalos 6,6% (49/741) e 0,1% (1/741) eram heterozigotos e homozigotos, respectivamente. A maior prevalência 31,7%, (32/101) foi observada em animais da linhagem de conformação. A mutação não foi observada nos animais de corrida. Não houve diferença significativa quanto à prevalência da mutação entre machos e fêmeas. Em 48,8% das propriedades onde as amostras foram colhidas haviam animais com a mutação causadora de PSSM1. A prevalência de PSSM1 observada neste estudo indica a relevância da enfermidade como diagnóstico diferencial para os casos de miopatia e a importância da orientação dos acasalamentos.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: PSSM1; gene *GYS1*; doença genética; miopatia; cavalos.

## Introdução

A miopatia por acúmulo de polissacarídeo (PSSM) é uma enfermidade muscular caracterizada pelo acúmulo anormal de glicogênio e inclusão de polissacarídeo nas fibras musculares esqueléticas (Valberg et al., 1992; Valentine et al., 2000). A PSSM foi descrita pela primeira vez por Valberg et al. (1992), após avaliarem biopsias musculares de nove equinos com histórico de episódios recorrentes de rabdomiólise.

A PSSM tipo 1 (PSSM1) é uma enfermidade autossômica dominante que ocorre devido à mutação pontual (c.926G>A) no gene *GYS1*. Esta mutação acarreta na substituição de um resíduo de arginina por uma histidina, na proteína codificada por este gene e leva ao acúmulo excessivo de glicogênio nas células musculares (McCue et al., 2008a).

Alguns cavalos são positivos para PSSM no exame histopatológico, mas não possuem a mutação no gene *GYS1*; estes cavalos são diagnosticados com PSSM tipo 2 (PSSM2) (McCue et al., 2008b; McCue et al.; McCue et al., 2009a).

McCue e Valberg (2007) estimaram que a prevalência da enfermidade em cavalos da raça Quarto de Milha (QM) nos Estados Unidos (EUA) variava entre 6 a 12%. O provável caráter hereditário da PSSM foi sugerido por De La Corte et al. (2002) e por McCue & Valberg (2007). A confirmação da hereditariedade foi realizada por McCue et al. (2008a) após a identificação de uma mutação pontual no gene responsável pela síntese de glicogênio 1 (*GYS1*) em cavalos diagnosticados com PSSM, no exame histopatológico.

Os sinais clínicos apresentados por cavalos com PSSM incluem rigidez e atrofia muscular, sudorese, relutância em se movimentar, fasciculações, fraqueza, andar rígido, mioglobinúria e decúbito (Valberg et al., 1999; Firshman, 2003; Aleman, 2008; McCue et al., 2009). Alguns equinos podem ser assintomáticos (Firshman et al., 2005; McCue et al., 2008a).

O teste genético para identificação da mutação no gene *GYS1*, é necessário para o diagnóstico da PSSM1 (McCUE et al., 2008a). Nos animais com suspeita de PSSM e negativos no teste genético, deve ser realizado o exame histopatológico (McCUE et al., 2009).

Devido à importância da enfermidade em outros países e a inexistência de dados epidemiológicos da ocorrência da PSSM1 no Brasil, o objetivo deste trabalho foi verificar a prevalência da mutação responsável pela PSSM1 em

equinos da raça QM no país, utilizados em cinco diferentes modalidades esportivas.

### **Material e Métodos**

Foram utilizadas amostras de DNA obtidas do sangue de 741 cavalos da raça QM, sendo 530 fêmeas e 211 machos, com idade variando entre um e 32 anos, registrados na Associação Brasileira de Criadores de Cavalo Quarto de Milha (ABQM), os quais eram provenientes de 41 propriedades. Estes animais pertenciam a linhagens utilizadas nas modalidades esportivas de rédeas (n=160), apartação (n=160), tambor e baliza (n=160), corrida (n=160) e conformação (n=101). Os procedimentos realizados foram previamente aprovados pela Câmara de Ética em Experimentação Animal institucional (Protocolo nº262/2011-CEUA).

O tamanho da amostra foi calculado utilizando o software OpenEpi, on line versão 3. A prevalência estimada de PSSM1 foi de 11,3% (Tryon et al., 2009), com margem de erro de 3%, população de 172.241 cavalos QM registrados no Brasil (ABQM, 2014) e intervalo de confiança de 95%, resultando em um cálculo de amostragem de 417 animais. Entretanto utilizou-se um número de animais (n=741) acima do mínimo necessário para a pesquisa.

Amostras de sangue foram colhidas em tubos com EDTA, e a extração do DNA sanguíneo foi realizada utilizando o Illustra™ Blood GenomicPrep Mini Spin Kit (GE Healthcare), de acordo com o protocolo recomendado pelo fabricante. Após a extração, o DNA foi testado para pureza (A260/280) e concentração no NanoDrop® 2000 spectrophotometer (Thermo Scientific™, DE, USA), para serem utilizadas na pesquisa as amostras deviam apresentar relação A260/A280 entre 1,8 e 2,1 e concentração mínima de 20 ng/μl.

A partir da sequência do gene *GYS1* (Gene ID: 100054723) depositada no Genbank™, foram desenhados oligonucleotídeos iniciadores (DZD-GYS1-F, 5'-AAGTGAAACATGGGACCTTCTCCC-3' e DZD-GYS1-R, 5'-ACTCAGCCATTGTTCTGACGCT-3') utilizando o programa Primer Express® (Life Technologies™). Os iniciadores amplificaram um produto de 279pb contendo a região da mutação pontual (c.926G>A), no gene *GYS1*, previamente descrita como responsável pela PSSM1.

As reações de PCR foram padronizadas para um volume final de 25 µL, contendo 2 µL do DNA extraído, 12,5 µL da enzima GoTaq® Green Master Mix, 2x (Promega™), 300 nM de cada um dos oligonucleotídeos iniciadores e água “nuclease-free” q.s.p.. A programação de termociclagem foi de 95°C/2 min, seguida por 40 ciclos de 95°C/30 s, 59°C/1 min e 72°C/1 min e extensão final de 72°C/7 min.

O tamanho dos produtos amplificados foi verificado por eletroforese (Major Science, Saratoga, CA, USA) em gel de agarose a 1,5% corado com GelRed™ (Biotium, Halward, CA, USA) e comparados com o marcador de peso molecular LowRanger 100 pb DNA ladder (Norgen™, BioTek Corporation, Ontario, Canada).

As amostras amplificadas foram purificadas com o NucleoSpin® Gel and PCR clean-up (Macherey-Nagel®, Duren, Alemanha), conforme a recomendação do fabricante. Após a purificação, 3 µL de cada uma das amostras foram submetidas à nova eletroforese em gel de agarose 1,5% corado com GelRed™ (Biotium, Halward, CA, USA) e 2µL foram submetidos à leitura no espectrofotômetro BioPhotometer (Eppendorf®, Hamburg, Germany), para verificação da qualidade e quantidade do material purificado.

Em seguida, 10 µL de produto de PCR purificado e 5 µL do oligonucleotídeo iniciador DZD-GYS1-R, foram submetidos ao sequenciamento direto usando o BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Life Technologies) e o sequenciador ABI 3500 Genetic Analyzer (Life Technologies). Após o sequenciamento, o controle de qualidade das sequências e dos eletroferogramas obtidos foi realizado utilizando o software Sequencing Analysis 5.3.1 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Em uma segunda etapa, as sequências e eletroferogramas foram novamente analisadas utilizando o programa Sequencher 5.1 (Gene Code Corporation), para verificação da sequência de nucleotídeos.

Após os procedimentos previamente descritos, foi possível identificar os genótipos de cada indivíduo para a região estudada do gene alvo e assim determinar a prevalência da mutação no gene *GYS1* na população amostrada. Os animais também foram separados em grupos de machos e fêmeas para avaliar a predisposição por sexo.

A prevalência da PSSM1 é apresentada de forma descritiva. A análise estatística para avaliar a predisposição entre machos e fêmeas para PSSM1 foi realizada utilizando o teste Qui Quadrado no programa GraphPad Prism versão 6. A diferença estatística foi considerada para  $p \leq 0,05$ .

## Resultados

A mutação no gene *GYS1* foi observada em 50 (6,7%) dos 741 animais testados, sendo que desses cavalos 49 (6,6%) eram heterozigotos e um equino era homozigoto (0,1%). A mutação foi mais frequente nos cavalos de conformação (31,7% 32/101). No quadro 1 são apresentados os animais portadores da mutação no gene *GYS1*, encontrados em cada modalidade esportiva estudada.

Quando a prevalência da mutação foi avaliada comparando-se machos e fêmeas não foi verificada diferença estatística entre os sexos em relação ao número total de animais ( $p=0,061$ ) amostrados ou dentro de cada modalidade estudada (Quadro 2).

Dos 41 locais onde as amostras foram colhidas em 20 (48,8%) foram encontrados pelo menos um animal com PSSM1 (Quadro 3). Em algumas propriedades foram encontrados cavalos de mais de uma modalidade esportiva, sendo que em nove de 13 locais (69,2%) onde havia cavalos de conformação a mutação foi identificada. O número de locais onde amostras para cada modalidade esportiva foi colhida e o número de propriedades onde cavalos com a mutação foram encontrados são apresentados no quadro 4.

## Discussão

O plantel de cavalos QM no Brasil foi formado a partir de animais importados dos EUA (ABQM, 2014). Apesar da PSSM1 estar presente nos cavalos norte-americanos (McCue et al., 2008b; Tryon et al., 2009) não era possível afirmar sobre a ocorrência da mutação no plantel brasileiro. Nesta pesquisa, além de padronizar o teste para PSSM1, demonstrou-se que 6,7% dos cavalos amostrados possuíam a mutação no gene *GYS1*, responsável pela enfermidade. A ocorrência da mutação no gene *GYS1* identificada neste estudo foi semelhante àsquelas observadas nos EUA em cavalos QM, 11,3% (Tryon et al., 2009) e 6,6% (McCue et al. 2010).

A presença da mutação indica que no Brasil a PSSM1 deve ser incluída como diagnóstico diferencial de miopatias. Apesar das miopatias serem comuns, identificar sua etiologia é sempre um desafio para os clínicos (Valberg, et al., 1992; Aleman, 2008). McCue et al. (2008b) ao realizarem o teste molecular em amostras de 831 cavalos com diagnóstico histopatológico de PSSM, encontraram a mutação no gene *GYS1* em 48,3% dos equinos de 17 raças diferentes. A PSSM foi diagnosticada em 48,5% (288/594) das biopsias de cavalos QM com histórico de afecções neuromusculares submetidas ao laboratório de doenças neuromusculares da Universidade de Minnesota (McCue et al., 2006). Esses achados reforçam a necessidade de realizar o teste genético para verificar se há a presença da mutação em todos os animais atendidos com histórico de miopatia.

Não foi realizada a avaliação clínica dos cavalos, portanto não se sabe quantos animais com a mutação no gene *GYS1*, encontrados neste estudo, apresentam ou já apresentaram sinais clínicos de miopatia. Alguns cavalos possuem a mutação responsável pela PSSM1, mas não desenvolvem sinais clínicos (McCue et al., 2008a). Apesar da não identificação de sinais clínicos específicos, muitos destes animais portadores de mutação podem ter queixa de inadequado desempenho atlético (McCue et al., 2009; Naylor et al., 2012).

Nos animais de corrida amostrados no atual estudo não foi detectada a mutação, enquanto que nos animais de tambor e baliza e apartação, a mutação foi identificada em apenas 3 (1,9%) e 4 (2,5%) cavalos respectivamente, demonstrando menor prevalência da PSSM1 nos animais destas modalidades. Tryon et al (2009) obtiveram resultados semelhantes para animais de tambor e baliza com 1,4% de prevalência, porém encontraram 6,7% de prevalência para animais de apartação e 2% para animais de corrida, resultados que demonstram que há diferenças entre o plantel brasileiro e o americano quanto à prevalência de PSSM1.

Nos animais de rédeas foram identificados 6,9% de animais positivos para PSSM1, resultado semelhante aos 4,3% apresentados por Tryon et al. (2009). A mutação foi identificada em 31,7% dos cavalos de conformação amostrados; nos EUA a prevalência da enfermidade nesta linhagem foi de 28,2% (Tryon et al., 2009). A alta prevalência de PSSM1 em cavalos de

conformação justifica que medidas de controle sejam tomadas para evitar o aumento de animais com a mutação, nesta categoria.

Ao comparar a prevalência da mutação entre machos e fêmeas observamos que não houve diferença estatística ( $p=0,06$ ), apesar de uma porcentagem maior de machos 9,5%, em relação a fêmeas 5,7% com PSSM1. Outros autores também não identificaram predisposição por sexo nos casos de PSSM, porém não realizaram o teste genético para diferenciar entre PSSM1 e PSSM2 (Firshman et al., 2003; McCue et al., 2006; Hunt et al., 2008; McGowan et al., 2009).

Um fato que chama a atenção é que em 48,8% (20/41) das propriedades foram encontrados pelo menos um animal positivo para PSSM1. Nas propriedades P4, P7, P8 e P10 todos os animais foram positivos para doença. Nos outros locais onde a mutação foi encontrada a prevalência variou entre 3,2 (1/31) e 50% (3/6), resultados semelhantes aos encontrados por McCue e Valberg (2007) ao realizarem biopsia muscular para diagnóstico histopatológico de PSSM em cavalos sem histórico de miopatia.

Nos haras muitos acasalamentos são realizados entre os equinos existentes na propriedade. Dos locais onde foram colhidas amostras de animais de conformação, em 69,2% (9/13) havia equinos positivos para PSSM e a prevalência nestes locais, foi acima de 20%, devido o caráter hereditário da doença. Se medidas de controle como a orientação dos acasalamentos não forem adotadas a mutação continuará sendo transmitida.

Conclui-se que a mutação no gene *GYS1* está presente nos animais QM no Brasil, ocorrendo em animais de rédeas, apartação, conformação e tambor e baliza. A maior prevalência da enfermidade ocorre nos cavalos de conformação. A presença da mutação foi identificada em 48,8% das propriedades estudadas, sendo assim, ressalta-se a importância da identificação da mutação, uma vez que a única maneira de prevenção da enfermidade é o direcionamento dos acasalamentos, retirando-se animais com PSSM1 dos programas de reprodução.

## Referências

ABQM 2014, Associação Brasileira de Criadores de Cavalos Quarto de Milha.

Disponível em: < <http://portalabqm.com.br/>. Acesso em 07/07/14.

- Aleman M. 2008. A review of equine muscle disorders. *Neuromuscular Disorders*. 18:277-287.
- Carlström B. 1932. Über die etiologie und pathogenese der kreuzlahme des pferdes (Haemaglobinaemia paralytica). *Skandinavisches Archiv Fur Physiologie*. 62:1-69.
- De La Corte F., Valberg S.J., MacLeay J.M. & Mickelson J.R. 2002. Developmental onset polysaccharide storage myopathy in 4 Quarter Horse foals. *Journal of Veterinary Internal Medicine*. 16:581-587.
- Firshman A.M., Valberg S.J., Bender J.B. & Finno C.J. 2003. Epidemiologic characteristics and management of polysaccharide storage myopathy in Quarter Horses. *American Journal of Veterinary Research*. 64 (10):1319-1327.
- Hunt L.M., Valberg S.J., Steffenhagen K. & McCue M.E. 2008. An epidemiological study of myopathies in Warmblood horses. *Equine Veterinary Journal*. 40(2):171-177.
- McCue M.E. & Valberg S.J. 2007. Estimated prevalence of polysaccharide storage myopathy among overtly healthy Quarter Horses in the United States. *Journal of the American Veterinary Medical Association*. 231(5):746-750.
- McCue M.E., Anderson S.M., Valberg S.J., Piercy R.J., Barakzai S.Z., Binns M.M., Distl O., Penedo M.C.T., Wagner M.L. & Mickelson J.R. 2010. Estimated prevalence of the type 1 Polysaccharide Storage Myopathy mutation in selected North American and European breeds. *Animal Genetics*. 41(S2):145-149.
- McCue M.E., Armien A.G., Lucio M., Mickelson J.R. & Valberg S.J. 2009. Comparative skeletal muscle histopathologic and ultrastructural features in two forms of Polysaccharide Storage Myopathy in horses. *Veterinary Pathology*. 46:1281-1291.
- McCue M.E., Ribeiro W.P. & Valberg S.J. 2006. Prevalence of polysaccharide storage myopathy in horses with neuromuscular disorders. *Equine Veterinary Journal*. 36(s): 340-344.

- McCue M.E., Valberg S.J., Lucio M. & Mickelson J.R. 2008b. Glycogen synthase 1 (GYS1) mutation in diverse breeds with Polysaccharide Storage Myopathy. *Journal of Veterinary Internal Medicine*. 22:1228-1233.
- McCue M.E., Valberg S.J., Miller M.B., Wade C., DiMauro S., Akman H.O. & Mickelson J.R. 2008a. Glycogen synthase (GYS1) mutation causes a novel skeletal muscle glycogenosis. *Genomics*. 91:458-466.
- McGowan C.M., McGowan T.W. & Patterson-Kane J.C. 2009. Prevalence of equine polysaccharide storage myopathy and others myopathy in two equine populations in the United Kingdom. *The Veterinary Journal*. 180:330-336.
- Naylor R.J., Luis-Fuentes V., Livesey L., Mobley C.B., Henke N., Brock K., Fernandez-Fuente M. & Piercy R.J. 2012. Evaluation of cardiac phenotype in horses with type 1 polysaccharide storage myopathy. *Journal of the Veterinary Internal Medicine*. 26:1464-1469.
- Tryon R.C., Penedo M.C.T., McCue M.E., McCue M.E., Valberg S.J., Mickelson J.R., Famula T.R., Wagner M.L., Jackson M., Hamilton M.J., Nootboom S. & Bannasch D.L. 2009. Evaluation of allele frequencies of inherited disease genes in subgroups of American Quarter Horses. *Journal of the American Veterinary Medical Association*. 234: 120-125.
- Valberg S.J., Cardinet III G.H., Carlson G.P. & DiMauro S. 1992. Polysaccharide storage myopathy associated with recurrent exertional rhabdomyolysis in horses. *Neuromuscular Disorders*. 2(5):351-359.
- Valberg S.J., Macleay J.M., Billstrom J.A., Hower-Moritz M.A. & Mickelson J.R. 1999. Skeletal muscle metabolic response to exercise in horses with "tying up" due to polysaccharide storage myopathy. *Equine Veterinary Journal*. 31(1):43-47.
- Valentine B.A., McDonough S.P., Chang Y.F. & Vonderchek A.J. 2000. Polysaccharide storage myopathy in Morgan, Arabian, and Stabdarbread Related horses and Wesh-cross Ponies. *Veterinary Pathology*. 37:193-196.

## Quadros

**Quadro 1:** Animais portadores da mutação previamente descrita no gene *GYS1* causadora de PSSM1.

<b>Modalidade esportiva</b>	<b>N</b>	<b>G/G (%)</b>	<b>A/A (%)</b>	<b>G/A (%)</b>
Rédeas	160	149 (93,1)	0 (0)	11 (6,9)
Apartação	160	156 (97,5)	0 (0)	4 (2,5)
Corrida	160	160 (100)	0 (0)	0 (0)
Conformação	101	69 (68,3)	1 (1)	31 (30,7)
Tambor/Baliza	160	157 (98,1)	0 (0)	3 (1,9)
<b>Total</b>	741	691 (93,3)	1 (0,1)	49 (6,6)

N: número de animais testados, G/G cavalos homocigotos normais, A/A animais homocigotos para PSSM1 e G/A animais heterocigotos para PSSM1.

**Quadro 2:** Prevalência de PSSM1 entre os sexos nas cinco modalidades esportivas e valor de p quando comparado dentro de cada modalidade esportiva e no total de animais amostrados.

<b>Modalidade Esportiva</b>	<b>Nº (%) de fêmeas amostradas</b>	<b>Nº (%) de animais com PSSM1</b>	<b>Nº (%) de machos amostrados</b>	<b>Nº (%) de animais com PSSM1</b>	<b>Valor de p</b>
Rédeas	91 (56,9)	4 (4,3)	69 (43,1)	7 (10,1)	0,209
Apartação	122 (76,2)	3 (2,5)	38 (23,8)	1 (2,6)	1
Corrida	132 (82,5)	0 (0)	28 (17,5)	0 (0)	-
Conformação	74 (73,3)	22 (29,7)	27 (26,7)	10 (37)	0,480
Tambor e baliza	111 (69,4)	1 (0,9)	49 (30,6)	2 (4,1)	0,222
<b>Total</b>	<b>530 (71,5)</b>	<b>30 (5,7)</b>	<b>211 (28,5)</b>	<b>20 (9,5)</b>	<b>0,061</b>

**Quadro 3:** Número de amostras colhidas em cada propriedade para as cinco modalidades esportivas estudadas e número de animais com PSSM1 encontrados em cada propriedade.

Propriedade	Nº de animais testados em cada modalidade, ( ) Nº de animais com PSSM1					Nº animais testados	Nº (%) de animais com PSSM1
	Red	Apa	Cor	Con	Ta/ba		
P1	0	0	0	6(2)	0	6	2 (33,3)
P2*	9(1)	0	0	0	1	10	1 (10)
P3	15(2)	0	0	0	0	15	2 (13,3)
P4	0	0	0	2(2)	0	2	2 (100)
P5*	1	1	4	0	9	15	0 (0)
P6	0	1	0	0	0	1	0 (0)
P7	0	0	0	1(1)	0	1	1 (100)
P8	0	0	0	1(1)	0	1	1 (100)
P9	0	6 (3)	0	0	0	6	3 (50)
P10	0	0	0	1 (1)	0	1	1 (100)
P11	4	3	1	3	1(1)	12	1 (8,3)
P12	1	48	0	0	0	49	0 (0)
P13	2	0	0	0	0	2	0 (0)
P14	1	0	2	1	20	24	0 (0)
P15	1	0	0	0	0	1	0 (0)
P16	3(1)	5	0	0	3	11	1 (9,1)
P17	0	0	0	0	31(1)	31	1 (3,2)
P18	2	8 (1)	0	0	0	10	1 (10)
P19	0	0	20	35 (9)	0	55	9 (16,3)
P20*	4	53	12	0	8	77	0 (0)
P21	0	0	0	0	20	20	0 (0)
P22	0	1	16	0	0	17	0 (0)
P23	0	0	8	0	0	8	0 (0)
P24	1	0	0	0	6	7	0 (0)
P25*	0	0	0	20(9)	7	27	9 (33,3)
P26	13	0	0	7	0	20	0 (0)
P27	0	17	0	0	0	17	0 (0)
P28	1	2	12	0	19	34	0 (0)
P29	0	0	22	0	0	22	0 (0)
P30	0	0	20	0	0	20	0 (0)
P31	0	0	0	1	1	2	0 (0)
P32#	4	7	5	0	9(1)	25	1 (4)
P33*	9	0	0	0	1	10	0 (0)
P34*	3(1)	1	29	18(7)	2	53	8 (15,1)
P35	0	0	0	5(1)	0	5	1 (20)
P36	31(2)	1	0	0	0	32	2 (6,2)
P37	4(1)	6	0	0	0	10	1 (10)
P38	4	0	0	0	0	4	0 (0)
P39	0	0	9	0	19	28	0 (0)
P40*	11	0	0	0	2	13	0 (0)
P41*	37(3)	0	0	0	0	37	3 (8,1)
<b>TOTAL</b>	<b>160</b>	<b>160</b>	<b>160</b>	<b>101</b>	<b>160</b>	<b>741</b>	<b>50 (6,7)</b>

Red, rédeas; Apa, apartação; Cor, corrida; Con, conformação, Ta/ba, tambor e baliza.

\* Central de reprodução ou centro de treinamento com cavalos de vários criadores.

# Colhidos de animais atendidos no Hospital Veterinário.

**Quadro 4:** Locais entre as 41 propriedades amostradas onde foram encontrados cavalos para cada modalidade esportiva, e número de locais onde cavalos com PSSM1 foram encontrados.

<b>Modalidade esportiva</b>	<b>Nº de locais colhidos para cada modalidade esportiva</b>	<b>Nº (%) de locais de colheita com animais com PSSM1</b>
Rédeas	22	7 (31,8)
Apartação	14	2 (14,3)
Corrida	13	0 (0)
Conformação	13	9 (69,2)
Tambor e baliza	17	3 (17,6)

### *CAPÍTULO III*

O artigo a seguir foi redigido em conformidade com as normas do periódico científico "Ciência Rural".

**Prevalência das mutações causadoras da Paralisia Periódica  
Hipercalêmica e Hipertermia Maligna em equinos da raça Quarto de Milha  
no Brasil**

Prevalence of the Hypercalemic Periodic Paralysis and Malignant Hyperthermia  
mutations in Quarter Horses in Brazil

**RESUMO**

Dentre as principais enfermidades genéticas de caráter dominante que acometem equinos da raça Quarto de milha (QM) destacam-se a paralisia periódica hipercalêmica (HYPP) e a hipertermia maligna (HM). A HYPP é causada por uma mutação pontual no gene *SCN4A* enquanto a HM ocorre devido à mutação pontual no gene *RYR1*. Apesar de estar presente nos cavalos QM no Brasil, dados sobre a prevalência da HYPP são escassos, e em relação a HM não se sabe se a enfermidade está presente no plantel nacional tampouco, se conhece sua prevalência. O objetivo deste trabalho foi verificar a prevalência das mutações responsáveis pela HYPP e pela HM em cavalos QM, utilizados em cinco modalidades esportivas. Foram utilizados DNA sanguíneo de 741 equinos; o teste genético para ambas as enfermidades foi padronizado e as amostras sequenciadas para identificação da mutação no gene alvo. A prevalência de HYPP na população amostrada foi de 4,2%, sendo que somente na linhagem de conformação foram identificados animais positivos (30,7%). A mutação responsável pela HM não foi detectada em nenhum dos animais testados. Medidas de controle mais efetivas devem ser adotadas para diminuir a prevalência da HYPP. Pelos resultados deste estudo a HM não possui relevância no plantel de equinos da raça QM no Brasil.

**Palavras-chave:** HYPP, gene *SCN4A*, gene *RYR1*, doença genética.

## ABSTRACT

Hyperkalemic Periodic Paralysis (HYPP) and Malignant Hyperthermia (MH) are considered major dominant genetic diseases which affect Quarter Horses (QH). The HYPP is caused by a point mutation in the *SCN4A* gene, whereas MH is due to a point mutation in the *RYR1* gene. Despite the presence of HYPP in Brazilian QH, limited data on the disease prevalence are available, and regarding MH, it is not known if the disease is found in Brazilian herds neither the prevalence in the country. The aim of this study was to investigate the mutations responsible for the development of HYPP and MH in QH, which belonged to five competitive disciplines. Blood DNA from 741 horses were used. Genetic tests were standardized for both diseases and samples were sequenced to identify the mutation on the target gene. The prevalence of HYPP on the sampled population was 4.2% and positive animals (30.7%) were only identified in the halter lineage. The mutation responsible for the development of MH was not detected in any of the evaluated animals. More effective actions on HYPP control should be done to reduce the disease prevalence. This study demonstrates that MH is not relevant in Brazilian QH herds.

Key words: HYPP, *SCN4A* gene, *RYR1* gene, genetic disease.

## INTRODUÇÃO

Importantes enfermidades genéticas têm sido identificadas na raça Quarto de Milha (QM) (TRYON, et al., 2009; BROSNAHAN et al., 2010). A paralisia periódica hipercalêmica (HYPP) (RUDOLPH et al., 1992) e a hipertermia maligna (HM) (ALEMAN, et al., 2004) estão entre as principais. A HYPP já foi identificada em equinos no Brasil (GARCIA et al., 1996), e a HM foi relatada no país apenas em humanos (MCWILLIAMS et al., 2002) e suínos (CARMO et al., 2010).

A HYPP é uma doença genética autossômica co-dominante que ocorre devido à substituição de uma citosina por uma guanina no gene *SCN4A* do canal de sódio no cromossomo 11, que leva à substituição de uma fenilalanina

por uma leucina (RUDOLPH et al., 1992). Todos os equinos com a mutação possuem em sua genealogia o garanhão Impressive (NAYLOR et al., 1992a; NAYLOR, 1994a). Além da raça QM a HYPP também ocorre nas raças Paint Horse e na Apallosa (FINNO et al., 2009).

Os sinais clínicos da HYPP ocorrem em forma de crises, sendo mais graves nos animais homozigotos para a mutação; animais heterozigotos podem ser assintomáticos ou em alguns casos apresentarem crises diárias (RUDOLPH et al., 1992; MEYER et al., 1999). Fasciculações musculares, miotonia, prolapso de terceira pálpebra, fraqueza muscular, dificuldade respiratória, decúbito e morte podem ser sinais clínicos da enfermidade (STEISS & NAYLOR, 1986; MEYER et al., 1999).

O teste genético para a identificação da mutação é necessário para o diagnóstico da HYPP (RUDOLPH et al., 1992). No Brasil, desde 2004, restrições foram impostas pela associação brasileira de criadores de cavalo Quarto de Milha (ABQM) para o registro dos animais positivos para a enfermidade (ABQM, 2014).

A HM é uma enfermidade autossômica dominante, que foi diagnosticada em equinos QM, após a ocorrência de hipertermia grave durante anestesia inalatória (ALEMAN et al., 2004; ALEMAN et al., 2005; FINNO et al., 2009). Os equinos acometidos possuem uma mutação pontual caracterizada pela substituição de uma citosina por uma guanina, na posição 7.360 da região codificante, no exón 46 (c.7360C>G), do gene receptor da riodina (*RYR1*) (ALEMAN et al., 2009).

Os sinais clínicos da HM podem ser desencadeados por anestésicos halogenados, relaxante muscular despolarizante, estresse, dor e episódios recorrentes de rabdomiólise (DENBOROUGH, 1998; ALEMAN et al., 2009). O principal sinal identificado é a hipertermia, que pode exceder 43°C. Sinais clínicos como taquicardia, taquipnéia, prolapso de terceira pálpebra, trismo mandibular (ALEMAN et al., 2009), sudorese intensa, rigidez muscular, rabdomiólise, incapacidade de permanecer em posição quadrupedal (DENBOROUGH, 1998; ALEMAN et al., 2005) mioglobínúria e morte súbita, podem estar relacionados com a enfermidade (ALEMAN, 2008; ALEMAN et al., 2009).

O teste genético para a identificação da mutação do gene *RYR1* é necessário para o diagnóstico da HM (ALEMAN et al., 2005; NIETO & ALEMAN, 2009). Não existem estudos no Brasil, que avaliaram a prevalência da HM em equinos, tampouco se sabe sobre a presença da mutação no plantel QM nacional.

A identificação dos equinos com HYPP e HM é necessária para que os acasalamentos possam ser orientados. O objetivo deste trabalho é verificar a prevalência da mutação no gene *SCN4A*, responsável pela HYPP e da mutação no gene *RYR1* responsável pela HM em equinos da raça QM utilizados em cinco modalidades esportivas no Brasil.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

O tamanho da amostra foi calculado utilizando o software OpenEpi, on line versão 3. A prevalência das enfermidades foi estimada em estudos prévios sendo que para HYPP foi de 2,2% (ZORDAN, 2000) e a para a HM de 1,3% (NIETO & ALEMAN, 2009), com margem de erro de 2%, população de 172.241 cavalos QM registrados no Brasil (ABQM, 2014) e intervalo de confiança de 99%, resultando em um cálculo de amostragem de 325 animais a serem testados para HYPP e 165 cavalos para HM. Entretanto utilizou-se um número de animais (n=741), acima do mínimo necessário para a pesquisa.

Foram utilizadas amostras de DNA obtidas do sangue de 741 cavalos da raça QM, sendo 530 fêmeas e 211 machos, com idade variando entre um e 32 anos, registrados na Associação Brasileira de Criadores de Cavalo Quarto de Milha (ABQM), os quais eram provenientes de 41 propriedades. Os animais eram utilizados nas modalidades esportivas de rédeas (n=160), apartação (n=160), tambor e baliza (n=160), corrida (n=160) e conformação (n=101). Os procedimentos realizados foram previamente aprovados pela Câmara de Ética em Experimentação Animal institucional (Protocolo nº262/2011-CEUA).

As amostras de sangue foram colhidas em tubos com EDTA, e a extração do DNA sanguíneo foi realizada utilizando o Illustra™ Blood GenomicPrep Mini Spin Kit (GE Healthcare), de acordo com o protocolo recomendado pelo fabricante. Após a extração, o DNA foi testado para pureza (A260/280) e concentração no NanoDrop® 2000 spectrophotometer (Thermo

Scientific™, DE, USA), para serem utilizadas na pesquisa as amostras deviam apresentar relação A260/A280 entre 1,8 e 2,1 e concentração mínima de 20 ng/μl.

A partir das sequências dos genes *SCN4A* (Gene ID: 100049793) e *RYR1* (Gene ID: 100034090) depositadas no Genbank™, foram desenhados oligonucleotídeos iniciadores utilizando o programa Primer Express® (Life Technologies™) (Tabela 1). Os iniciadores amplificaram as regiões, nos genes *SCN4A* e *RYR1*, que continham as mutações previamente descritas como responsáveis pela HYPP e HM.

As reações de PCR foram padronizadas para um volume final de 25 μL, contendo 2 μL do DNA extraído, 12,5 μL da enzima GoTaq® Green Master Mix, 2x (Promega™), 300 nM de cada oligonucleotídeo iniciador e água “nuclease-free” q.s.p.. A programação de termociclagem foi de 95°C/2 min, seguida por 40 ciclos de 95°C/30 s, 59°C/1 min e 72°C/1 min e extensão final de 72°C/7 min.

O tamanho dos produtos amplificados foi verificado por eletroforese (Major Science, Saratoga, CA, USA) em gel de agarose a 1,5% corado com GelRed™ (Biotium, Halward, CA, USA) e comparados com o marcador de peso molecular LowRanger 100 pb DNA ladder (Norgen™, BioTek Corporation, Ontario, Canada).

As amostras amplificadas foram purificadas com o NucleoSpin® Gel and PCR clean-up (Macherey-Nagel®, Duren, Alemanha), conforme a recomendação do fabricante. Após a purificação, 3 μL de cada uma das amostras foram submetidas à nova eletroforese em gel de agarose 1,5% corado com GelRed™ (Biotium, Halward, CA, USA) e 2μL foram submetidos à leitura no espectrofotômetro BioPhotometer (Eppendorf®, Hamburg, Germany), para confirmação da presença do produto amplificado e verificação da qualidade e quantidade do material purificado.

Em seguida, 10 μL de produto de PCR purificado com 5 μL do oligonucleotídeo iniciador *SCN4A*-F ou *RYR1*-F, foram submetidos ao sequenciamento direto usando o BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Life Technologies) e o sequenciador ABI 3500 Genetic Analyzer (Life Technologies). Após o sequenciamento, o controle de qualidade das sequências e dos eletroferogramas obtidos foi realizado utilizando o software

Sequencing Analysis 5.3.1 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Em uma segunda etapa, as sequências e eletroferogramas foram novamente analisadas utilizando o programa Sequencher 5.1 (Gene Code Corporation) para verificação da sequência de nucleotídeos.

Após os procedimentos previamente descritos, foi possível identificar os genótipos de cada indivíduo para o gene alvo e assim determinar a prevalência da mutação no gene *SCN4A* e *RYR1* na população amostrada. Os resultados estão apresentados de maneira descritiva.

## RESULTADOS

A prevalência da mutação no gene *SCN4A* responsável pela HYPP foi de 4,2%. Dos 741 animais testados, 31 possuíam a mutação, sendo 29 cavalos heterozigotos e dois homozigotos. Todos os animais positivos eram da linhagem de conformação; a prevalência nesta modalidade foi de 30,7% (Tabela 2).

Dos 101 animais da linhagem de conformação amostrados, 48 (47,5%) nasceram até o ano de 2004 (ano em que restrição para o registro dos animais positivos foi adotada) e 53 (52,5%) nasceram a partir de 2005. Dos 31 animais identificados com a mutação responsável pela HYPP, 11 (35,5%) nasceram até 2004 e 20 (64,5%) nasceram a partir de 2005. A prevalência da enfermidade foi de 22,9% para os animais nascidos até 2004 e de 37,7% para os nascidos a partir de 2005.

Das 41 propriedades visitadas, em 13 foram colhidas amostras de cavalos da linhagem de conformação. Destes 13 locais, em sete (53,8%) havia animais portadores da mutação. Em um dos locais havia apenas um cavalo da raça QM e este foi positivo para HYPP. Excluindo este local, a prevalência de animais positivos variou entre 15% e 50%, nas propriedades onde a mutação foi identificada.

Não se identificou a mutação no gene *RYR1*, responsável pela HM em nenhum dos cavalos amostrados.

## DISCUSSÃO

A prevalência da mutação responsável pela HYPP encontrada neste estudo foi de 4,2%, valor maior que os 2,2% descritos no Brasil por ZORDAN, (2000), autor este, que realizou o teste em 182 cavalos e encontrou quatro heterozigotos para HYPP, porém não mencionou à qual linhagem pertencia os cavalos testados. Se considerarmos o erro padrão de 2%, os resultados dos trabalhos foram semelhantes. Nos EUA, TRYON et al. (2009) identificaram 1,5% de prevalência em um grupo QM, sem diferenciar por modalidade esportiva.

Não foram identificados animais positivos para HYPP nas modalidades esportivas de rédeas, apartação, tambor e baliza e corrida. TRYON et al. (2009) também não encontraram animais de rédeas, apartação e corrida positivos; na modalidade de tambor e baliza, esses autores identificaram apenas um animal (1,3%) com a mutação. Esses resultados indicam uma alta concentração de HYPP nos cavalos de conformação.

Ao testarem para HYPP os cavalos QM mais pontuados no ranking da AQHA na modalidade de conformação, TRYON et al. (2009) encontraram uma prevalência de 56,4%, resultado que está acima dos 30,7% encontrados neste estudo, onde os animais não foram selecionados pelo desempenho esportivo. Uma das principais características fenotípicas avaliadas nos animais durante as provas de conformação é a musculabilidade (NAYLOR, 1994a). Os equinos com HYPP possuem a musculatura bem desenvolvida, provavelmente devido ao aumento da contração muscular, que pode levar a hipertrofia. Os bons resultados em competições acarretaram a seleção dos animais positivos para HYPP (NAYLOR, 1994b), justificando a maior prevalência encontrada por TRYON et al. (2009), quando comparado ao presente estudo.

No Brasil, desde primeiro de julho de 2004 todos os QM descendentes do garanhão Impressive, obrigatoriamente necessitam do teste genético e o resultado deve constar no registro do animal e desde primeiro de julho de 2007 está proibido o registro de animais homozigotos para a enfermidade. Essas medidas foram adotadas visando diminuir a prevalência da mutação (ABQM, 2014). Neste estudo, a prevalência da enfermidade foi de 22,9% para os animais nascidos até 2004 e de 37,7% para os nascidos a partir de 2005, o que

demonstra que a medida de controle imposta pode não estar sendo eficaz para diminuir a prevalência da enfermidade. Talvez a maior dificuldade para se controlar a HYPP, como já mencionado, seja o sucesso obtido por cavalos positivos nas competições em que participam (NAYLOR, 1994b). A existência de animais positivos em 53,8% dos locais onde amostras de animais de conformação foram colhidas, reforça a necessidade de novas medidas de controle.

Neste estudo não se identificou nenhum animal com a mutação no gene *RYR1*, responsável pela HM. O único trabalho encontrado na literatura compilada que estudou a prevalência da HM foi realizado por NIETO & ALEMAN, (2009) onde 225 cavalos foram testados e três animais (1,3%) eram heterozigotos para a mutação. Vale ressaltar, que o número de animais testados no presente estudo, foi 4,5 vezes maior que o considerado o mínimo necessário para a realização da pesquisa, com um intervalo de confiança de 99%.

Segundo ALEMAN et al. (2009), a HM está presente em equinos da linhagem de conformação. Apesar de não ter sido identificado nenhum animal positivo neste estudo, a HM deve ser incluída como diagnóstico diferencial nos casos de hipertermia e morte súbita durante a anestesia geral inalatória, principalmente nos QM desta linhagem.

## **CONCLUSÃO**

A elevada prevalência de HYPP observada nos animais de conformação evidencia a importância da enfermidade no contexto do mercado do cavalo QM desta linhagem. O fato de a mutação ter sido identificada em 53,8% das propriedades onde amostras desta categoria foram colhidas indica que a presença do alelo mutante pode não estar sendo considerado durante a escolha dos acasalamentos, o que pode levar a um aumento significativo do número de cavalos afetados pela enfermidade. Os achados deste estudo indicam que a medida adotada para diminuir a prevalência da enfermidade pode não estar sendo eficaz, o que torna necessário a adoção de outras estratégias para diminuir a prevalência da mutação.

Não se poder afirmar que a HM não está presente nos equinos QM no Brasil, mas os resultados indicam que a enfermidade não possui relevância no plantel QM no país.

## REFERÊNCIAS

- ALEMAN, M. et al. Association of a mutation in the ryanodine receptor 1 gene with equine malignant hyperthermia. **Muscle Nerve**. v.30, p. 356-365, 2004.
- ALEMAN, M. et al. Malignant hyperthermia in a horse anesthetized with halothane. **Journal of Veterinary Internal Medicine**. v.19, p.363-367, 2005.
- ALEMAN, M. et al. Malignant hyperthermia associated with ryanodine receptor 1 (C7360G) mutation in Quarter Horses. **Journal of Veterinary Internal Medicine**. v.23, p.329-334, 2009.
- ALEMAN, M. A review of equine muscle disorders. **Neuromuscular Disorders**. v.18, p.277-287, 2008.
- BROSNAHAN, M.M. et al. Equine clinical genomics: A clinician's primer. **Equine Veterinary Journal**. v.42, n.7, p.658-670, 2010.
- CARMO, P.L. et al. Intravenous administration of azumolene to reverse malignant hyperthermia in swine. **Journal of Veterinary Internal Medicine**. v.24, p.1224-1228, 2010.
- DENBOROUGH, M. Malignant hyperthermia. **Lancet**. v.352, p.1131-1136, 1998.
- FINNO, C.J. et al. Equine diseases caused by known genetic mutations. **The Veterinary Journal**. v. 179, p. 336-347, 2009.
- GARCIA, J.F. et al. Utilização de marcadores de DNA para o diagnóstico genômico de animais domésticos: 2. Detecção da mutação pontual causadora da Paralisia Hipercalemica Periódica (HYPP) em equinos da raça Quarto de Milha. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**. v. 33, n.3, p. 136-139, 1996.
- MCWILLIAMS, S. et al. Novel skeletal muscle ryanodine receptor mutation in a large Brazilian family with malignant hyperthermia. **Clinical Genetics**. v.62, p. 80-83, 2002.
- MEYER, T.S. et al. Hyperkalaemic periodic paralysis in horses: a review. **Equine Veterinary Journal**. v. 31, n. 5, p. 362-367, 1999.

- NAYLOR, J. Equine hiperkalemic periodic paralysis: Review and implications. **The Canadian Veterinary Journal**. v.35, p. 279-285, 1994a.
- NAYLOR, J. et al. Inheritance of Myotonic Discharges in American Quarter Horse and the relations to hyperkalemic periodic paralysis. **Canadian Journal of Veterinary Research**. v.56, p.62-66, 1992a.
- NAYLOR, J.M. Selection of Quarter Horse affected with hyperkalemic periodic paralysis by show judges. **Journal of the American Veterinary Research**. v. 204, n. 6, p. 926-928, 1994b.
- NIETO, J.E.; ALEMAN, M. A rapid detection method for the ryanodine receptor 1 (C7360G) mutation in Quarter Horses. **Journal of Veterinary Internal Medicine**. v. 23, p. 619-622, 2009.
- RUDOLPH, J.A. et al. Periodic paralysis in Quarter Horses: A sodium channel mutation disseminated by selective breeding. **Nature Genetics**. v.2, p. 144-147, 1992.
- STEISS, J.E.; NAYLOR, J.M. Episodic muscle tremors in a Quarter Horse: Resemblance to hyperkalemic periodic paralysis. **The Canadian Veterinary Journal**. v.27, p. 332-335, 1986.
- TRYON, R.C. et al. Evaluation of allele frequencies of inherited disease genes in subgroups of American Quarter Horses. **Journal of the American Veterinary Medical Association**. v.234, p. 120-125, 2009.
- ZORDAN, P.A.L. **Levantamento da frequência da alelo mutante causador da paralisia periódica hipercalêmica (HYPP) em cavalos da raça Quarto de Milha**. 2000. 26f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Universidade Federal de Minas Gerais – Escola de Veterinária, Belo Horizonte.

**Tabelas**

Tabela 1: Oligonucleotídeos iniciadores desenhados para os genes *SCN4A* e *RYR1*.

<b>Oligonucleotídios iniciadores</b>	<b>Produto amplificado</b>
SCN4A-F. 5'-ACGAAGCAGGTGTTTCGACAT-3'	441 pb
SCN4A-R 5'-ATTACAGTGTGTGCAGGCAA-3'	
RYR1-F 5'-AGCTGGGCGTCCTAGAGTTA-3'	208 pb
RYR1-R 5'-ATCTGCAGAGGGAGGCTGATGAT-3'	

Tabela 2: Animais normais e portadores da mutação no gene *SCN4A* causadora de HYPP.

<b>Modalidade esportiva</b>	<b>N</b>	<b>C/C (%)</b>	<b>C/G (%)</b>	<b>G/G (%)</b>
Rédeas	160	160 (100)	0 (0)	0 (0)
Apartação	160	160 (100)	0 (0)	0 (0)
Tambor/baliza	160	160 (100)	0 (0)	0 (0)
Corrida	160	160 (100)	0 (0)	0 (0)
Conformação	101	70 (69,3)	29 (28,7)	2 (1,98)
<b>Total</b>	<b>741</b>	<b>710 (95,82)</b>	<b>29 (3,91)</b>	<b>2 (0,27)</b>

N: número de animais testados, C/C cavalos homocigotos normais, C/G animais heterocigotos para HYPP, G/G animais homocigotos para HYPP.

*DISCUSSÃO GERAL*

## DISCUSSÃO GERAL

Durante a realização da colheita das amostras, com exceção da HYPP que já havia sido diagnosticada no Brasil, observou-se que proprietários, funcionários e a maioria dos médicos veterinários desconheciam a PSSM1 e a HM. Ocorreu dificuldade na autorização para a colheita das amostras em muitos locais, sendo que em alguns, a amostragem não foi permitida. Em contrapartida muitos proprietários e médicos veterinários foram muito solícitos em colaborar com a pesquisa e ficaram satisfeitos em receber informações sobre estas enfermidades.

Um ponto importante do trabalho foi a padronização dos testes para PSSM1 e HM no Brasil. Até então estes exames não eram realizados no país e a confirmação do diagnóstico era possível apenas enviando amostras de DNA para serem testadas nos EUA. A divulgação sobre a presença da mutação responsável pela PSSM1 no plantel nacional é necessária para que haja a conscientização dos proprietários e criadores quanto à importância da enfermidade. Muitos animais portadores de PSSM1 podem ter queixa de inadequado desempenho atlético mesmo sem apresentar sinais clínicos evidentes (MCCUE et al., 2009; NAYLOR et al., 2012).

A maior prevalência para a mutação responsável pela PSSM1 (31,7%) e para HYPP (30,7%) foi identificada nos animais da linhagem de conformação. Em 8,9% (9/101) destes cavalos foram encontradas tanto a mutação para PSSM1 quanto para HYPP. TRYON et al. (2009), identificaram 14,5% (21/110) de cavalos desta linhagem com ambas as mutações. A PSSM1 e a HYPP possuem sinais clínicos em comum, como fasciculações musculares, fraqueza, decúbito e morte (STEISS & NAYLOR, 1986; MEYER et al., 1999; MCCUE et al., 2008a), portanto, é interessante que seja realizado o teste genético para ambas as mutações, pois dependendo do quadro clínico que o animal estiver apresentando, pode ser difícil diferenciá-las.

Outro fator importante é o manejo da alimentação dos animais que possuam ambas as mutações (PSSM1 e HYPP). Para cavalos com HYPP é recomendado o uso de dietas que forneçam glicose por esta facilitar a entrada do potássio para o interior das células e estas dietas são à base de carboidratos não estruturais como o milho e o melaço (SPEIR, 2006). Já nos

casos de PSSM1 os carboidratos não estruturais devem ser retirados da dieta (FIRSHMAN et al., 2003). Portanto para os animais positivos para ambas as enfermidades, as orientações quanto à alimentação não são regras e devem ser ajustadas de acordo com a necessidade de cada cavalo e pode ser necessário adequá-las periodicamente.

Enquanto a HYPP está restrita aos cavalos de conformação, a PSSM1, apesar ter maior prevalência também nesta linhagem, foi encontrada nas linhagens de trabalho (rédeas e apartação) e velocidade (tambor e baliza); somente nos QM de corrida a mutação não foi detectada. TRYON et al., (2009) encontraram nos EUA animais com PSSM1 em todas as modalidades esportivas avaliadas, inclusive nos animais de corrida.

A prevalência de 6,7% para a mutação responsável pela PSSM1, alerta para que o teste genético seja realizado em todos os animais que estão ou que entrarão em reprodução. Hoje no Brasil a presença da mutação não é levada em consideração na escolha dos acasalamentos. Alguns animais com a mutação identificados neste estudo estavam em centrais de reprodução. Se medidas de controle não forem adotadas a PSSM1 continuará sendo transmitida.

Nenhum cavalo com a mutação no gene *RYR1* responsável pela HM foi encontrada neste estudo. Não se pode afirmar que a enfermidade não ocorra nos cavalos da raça QM no Brasil, mas os resultados demonstram que a HM tem pouca relevância no cenário nacional, diferentemente do que ocorre nos EUA, onde a prevalência encontrada foi de 1,3% (TRYON et al., 2009).

*CONCLUSÃO GERAL*

## CONCLUSÕES GERAIS

A padronização do teste molecular para PSSM1 e HM no Brasil, permitirá que médicos veterinários e criadores utilizem esta ferramenta para a escolha dos acasalamentos, evitando assim a transmissão do alelo mutado.

A prevalência da mutação responsável pela PSSM1 no Brasil é de 6,7%, esta enfermidade deve ser incluída como diagnóstico diferencial nos casos de miopatia. A mutação ocorre nos animais de rédeas, apartação, conformação e tambor e baliza e não foi identificada nos cavalos de corrida.

A prevalência da HYPP foi de 4,2%, sendo a mutação identificada somente nos animais de conformação (30,7%). Resultados indicam que as medidas de controle adotadas no país para diminuir a prevalência da HYPP não estão sendo eficazes.

A mutação responsável pela HM não foi identificada na população amostrada, demonstrando que a enfermidade não possui relevância no país. Entretanto o teste genético sempre deve ser realizado quando houver suspeita clínica.

O contato com proprietários e médicos veterinários de campo, evidenciou que a PSSM1 e a HM são pouco conhecidas. Principalmente no caso da PSSM1, ações de conscientização e informações sobre a importância da enfermidade devem ser realizadas.

Conhecer os animais que possuem o alelo mutante para PSSM1 e HYPP, juntamente com a criteriosa escolha dos acasalamentos, são medidas fundamentais para diminuir a prevalência destas enfermidades.

*REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS CAPÍTULO I*

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS CAPÍTULO I

ALEMAN, M. 2008. A review of equine muscle disorders. *Neuromuscular Disorders*. v. 18, p. 277-287, 2008.

ALEMAN, M.; BROSNAN, R. J.; WILLIAMS, D. C.; LE COUTEUR, R. A.; IMAI, A.; THARP, B. R.; STEFFEY, E. P. Malignant hyperthermia in a horse anesthetized with halothane. *Journal of Veterinary Internal Medicine*. v. 19, p. 363-367, 2005.

ALEMAN, M.; NIETO, J. E.; MAGDESIAN, K. G. Malignant hyperthermia associated with ryanodine receptor 1 (C7360G) mutation in Quarter Horses. *Journal of Veterinary Internal Medicine*. v. 23, p. 329-334, 2009.

ALEMAN, M.; RIEHL, J.; ALDRIDGE, B. M.; LECOUNTEUR, R. A.; STOTT, J. L.; PESSAH I. N. Association of a mutation in the ryanodine receptor 1 gene with equine malignant hyperthermia. *Muscle Nerve*. v. 30, p. 356-365, 2004.

AMORIM, R. M.; RINO, A. S.; DAL-PAI-SILVA, M.; BORGES, A. S.; OLIVEIRA-FILHO, J. P.; FREITAS, N. N.; MAIA, L.; REZENDE, L. A. L. Aspectos morfológicos de biópsias musculares em equinos com miopatia sob forma de surto. *Pesquisa Veterinária Brasileira*. v. 31, n. 7, p. 579-585, 2011.

ANNANDALE, E. J.; VALBERG, S. J.; MICKELSON, J. R.; SEAQUIST, E. R. Insulin sensitivity and skeletal muscle glucose transport in horses with equine polysaccharide storage myopathy. *Neuromuscular Disorders*. v. 14, p. 666-674, 2004.

ARAÚJO, C. E.; BADIAL, P. R.; DELFIOL, D. J. Z.; OLIVEIRA-FILHO, J.P.; ARAÚJO JÚNIOR, J.P.; BORGES, A. S. Ocorrência de cavalos Quarto de Milha portadores da mutação responsável pela deficiência da enzima ramificadora de glicogênio. in: XV Conferência Anual Abreveq, 2014, Campos do Jordão, SP. p. 203.

BADIAL, P. R.; OLIVEIRA-FILHO, J. P.; WINAND, N. J.; BORGES, A. S. Allele frequency of hereditary equine regional dermal asthenia in American Quarter horses in Brazil determined by quantitative real-time PCR with high resolution melting analysis. *The Veterinary Journal*. v. 199, n. 2, p. 306-307, 2014.

BORGIA, L. A.; VALBERG, S. J.; MCCUE, M. E.; PAGAN, J. D.; ROE, C. R. Effect of dietary fats with odd or even numbers of carbon atoms on metabolic response and muscle damage with exercise in Quarter Horse-type horses with

- type 1 polysaccharide storage myopathy. *American Journal of Veterinary Research*, v. 71, n. 3, p. 326-336, 2010.
- BOWLING, A. T.; BYRNS, G.; SPIER, S. Evidence for a single pedigree source of the hyperkalemic periodic paralysis susceptibility gene in quarter horses. *Animal genetics*, v. 27, n. 4, p. 279-281, 1996.
- BROSNAHAN, M. M.; BROOKS, S. A.; ANTCZAK, D. F. Equine clinical genomics: A clinician's primer. *Equine Veterinary Journal*. v. 42, n.7, p. 658-670, 2010.
- CARLSTRÖM, B. Über die atologic und pathogenese der kreuzlahme des pferdes (Haemaglobinaemia paralytica). *Skandinavisches Archiv Fur Physiologie*. v. 62, p. 1-69, 1932.
- CARMO, P. L.; ZAPATA-SUDO, G.; TRACHEZ, M. M.; GUIMARÃES, S. E. F.; DEBOM, R.; RIZZI, M. D. R.; SUDO, R. T. Intravenous administration of azumolene to reverse malignant hyperthermia in swine. *Journal of Veterinary Internal Medicine*. v. 24, p. 1224-1228, 2010.
- CARPENTER, R. E. Complications and emergencies. Malignant hyperthermia. In: DOHERTY, T.; VALVERDE, A. *Manual of Equine Anesthesia and Analgesia*. Oxford: Blackwell Publishing Ltd, 2006. Cap. 21, p.305 -337.
- CAUDILL, A. HYPP survival guide. *The American Quarter Horse Journal*. 2014. Disponível em: <http://www.americashorsedaily.com/images/pdfs/hypp-survival-guide.pdf>. acesso em 28 de julho de 2014.
- COX, J. H. An episodic weakness in four horses associated with intermittent serum hyperkalemia and the similarity of the disease to hyperkalemic periodic paralysis in man. In: *Proceedings of the annual convention of the American Association of Equine Practitioners (USA)*. v.21, p. 383-391, 1985.
- COX, J. H.; DEBOWES, R. M. Episodic weakness caused by hyperkalemic periodic paralysis in horses. *The Compendium on continuing education for the practicing veterinarian (USA)*, 1990.
- DE LA CORTE, F.; VALBERG, S. J.; MACLEAY, J. M.; MICKELSON, J. R. Developmental onset polysaccharide storage myopathy in 4 Quarter Horse foals. *Journal of Veterinary Internal Medicine*. v. 16, p. 581-587, 2002.
- DENBOROUGH, M. 1998. Malignant hyperthermia. *Lancet*. 352:1131-1136.
- FINNO, C. J.; SPIER, S. J.; VALBERG, S. J. Equine diseases caused by known genetic mutations. *The Veterinary Journal*. v. 179, n.3, p. 336-347, 2009.

FIRSHMAN, A. A.; BAIRD, J. D.; VALBERG, S. J. Prevalences and clinical signs of polysaccharide storage myopathy and shivers in Belgian Draft horses. *Journal of the American Veterinary Medical Association*. v. 227, n. 12, p. 1958-1964, 2005.

FIRSHMAN, A. A.; VALBERG, S. J.; BAIRD, J. D.; HUNT, L.; DIMAURO, S. Insulin sensitivity in Belgian horses with polysaccharide storage myopathy. *American Journal of Veterinary Research*. v. 69, n. 6, p. 818-823, 2008.

FIRSHMAN, A. A.; VALBERG, S. J.; BENDER, J. B.; ANNANDALE, E. J.; HAYDEN, D. W. Comparasion of histopathologic criteria and skeletal muscle fixation techniques for the diagnosis of polysaccharide storage myopathy in horses. *Veterinary Pathology*. v. 43, p. 257-269, 2006.

FIRSHMAN, A. M.; VALBERG, S.J.; BENDER, J. B.; FINNO, C. J. Epidemiologic characteristics and management of polysaccharide storage myopathy in Quarter Horses. *American Journal of Veterinary Research*. v. 64, n. 10, p. 1319-1327, 2003.

FONTAINE, B.; PLASSART-SCHIESS, E.; NICOLE, S. Diseases caused by voltage-gated ion channels. *Molecular aspects of medicine*. v. 18, n. 6, p. 415-463, 1997.

FOREMAN, J. H. The exhausted horse syndrome. *The Veterinary clinics of North America. Equine practice*. v. 14, n.1, p. 205-219, 1998.

FUJII, J.; OTSU, K.; ZORZATO, F.; DE LEON S.; KHANNA, V. K.; WEILER, J. E.; O'BRIEN, P. J.; MACLENNAN, D. H. Identification of a mutation in porcine ryanodine receptor associated with malignant hyperthermia. *Science*. v. 253, p. 448-451, 1991.

GARCIA, J. F.; DO AMARAL GURGEL, A. S.; VISINTIN, J. A.; LUNGE, V. R.; DUARTE, M. B.; BERTOLLI, J. L. Utilização de marcadores de DNA para o diagnóstico genômico de animais domésticos: 2. Detecção da mutação pontual causadora da Paralisia Hipercalemica Periódica (HYPP) em eqüinos da raça Quarto de Milha. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*. v. 33, n.3, p. 136-139, 1996.

GRINT, N.; GORVY, D.; DUGDALE, A. Hyperthermia and delayed-onset myopathy after recovery from anesthesia in a horse. *Journal of Equine Veterinary Science*. v. 27, n.5, p. 221-227, 2007.

HARRIS, M. C.; SWINNEY, N. J. *Horses: The origins and characteristics of 100 breeds*. New York, Mtero Books. 2010, 240p.

HARRIS, P. A.; MAYHEW I. G. 2000. Enfermidade musculoesquelética. In: REED, S.M.; BAYLY, W.M. *Medicina interna equina*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. cap. 8, p. 321-367.

HARVEY, R.C. Thermoregulation. In. DOHERTY, T.; VALVERDE, A. *Manual of Equine Anesthesia and Analgesia*. Oxford: Blackwell Publishing Ltd, 2006. Cap. 10, p. 124-128.

HILDEBRAND, S. V.; HOWITT, G. A. Succinylcholine infusion associated with hyperthermia in ponies anesthetized with halothane. *American Journal of Veterinary Research*. v. 44, n. 12, p. 2280-2284, 1983.

HINCHCLIFF, K. W.; KANEPS, A. J.; GEOR, R. J. *Equine sports medicine and surgery*. Elsevier Health Sciences, 2013.

HOFFMAN, E. P.; LEHMANN-HORN, F.; RÄDEL, R. Overexcited or inactive: ion channels in muscle disease. *Cell*, v. 80, n. 5, p. 681-686, 1995.

HOPKINS P. M. Malignant hyperthermia: advances in clinical management and diagnosis. *British journal of Anaesthesia*. v. 85, n. 1, p. 118-128, 2000.

HOPKINS, P. M.; HALSALL, P. J.; ELLIS, F. R. Diagnosing malignant hyperthermia susceptibility. *Anaesthesia*. v. 49, n. 5, p. 373-375, 1994.

HUNT, L. M.; VALBERG, S. J.; STEFFENHAGEN, K.; MCCUE, M. E. An epidemiological study of myopathies in Warmblood horses. *Equine Veterinary Journal*. v. 40, n. 2, p. 171-177, 2008.

KLEIN, L. Anesthetic complications in the horse. *The Veterinary Clinics of North America. Equine Practice*. v. 6, n. 3, p. 665-692, 1990.

KLEIN, L. V. Case report: A hot horse. *Veterinary Anesthesia*. v. 2, p. 4142, 1975.

KLEIN, L.; AILES, N.; FACKELMAN, G. E.; KELLON, E.; ROSENBERG, H. Postanesthetic equine myopathy suggestive of malignant hyperthermia: a case report. *Veterinary Surgery*. v. 18, n.6, p. 479-482, 1989.

KOLLBERG, G.; TALINIUS, M.; GILLJAM, T.; SMITH, I. O.; FORSANDER, G.; JOTORP, P.; OLDFORS, A.; HOME, E. Cardiomyopathy and exercise intolerance in muscle glycogen storage disease 0. *The New England Journal of Medicine*. v. 357, p. 1507-1514, 2007.

- LARACH, M. G. Standardization of the caffeine halothane muscle contracture test. *Anesthesia & Analgesia*. v. 69, n.4, p. 511-515, 1989.
- LARCHER, T.; HERSZBERG, B.; MOLON-NOBLOT, S.; GUIGAND, L.; CHAFFAUX, S.; GUERIN, G.; CHEREL, Y. Polysaccharide storage myopathy in Cob Normand draft horses. *Veterinary Pathology*. v. 45, p. 154-158, 2008.
- LEHMANN-HORN, F.; KÜTHER, G.; RICKER, K.; GRAFE, P.; BALLANIY, K.; RÜDEL, R. Adynamia episodica hereditaria with myotonia: A non-inactivating sodium current and the effect of extracellular pH. *Muscle & Nerve*, v. 10, n. 4, p. 363-374, 1987.
- LOHMANN, K. Equine myopathies-an update (Part 2). *Large Animal Veterinary Rounds*, v. 8, n. 10, p. 1-6, 2008.
- MACLEAY, J. M. Diseases of the musculoskeletal system. In. REED, S. M.; BAYLY, W. M.; SELLON, D. C. *Equine Internal Medicine*. 2 ed. Saunders, p. 466-431, 2004.
- MACLENNAN, D. H. The genetic basis of malignant hyperthermia. *Trends in Pharmacological Sciences*. v. 13, p. 330-334, 1992.
- MCCARTHY, T. V.; HEALY, J. M.; HEFFRON, J. J.; LEHANE, M.; DEUFEL, T.; LEHMANN-HORN, F.; FARRAL, M.; JOHNSON, K. Localization of the malignant hyperthermia susceptibility locus to human chromosome 19q12-13.2. *Nature*. v. 343, p. 562-564, 1990.
- MCCARTHY, T. V.; QUANE, K. A.; LYNCH, P. J. Ryanodine receptor mutations in malignant hyperthermia and central core disease. *Human Mutation*. v. 15, n. 5, p. 410-417, 2000.
- MCCUE, M. E.; ANDERSON, S. M.; VALBERG, S. J.; PIERCY, R. J.; BARAKZAI, S. Z.; BINNS, M. M.; DISTL, O.; PENEDO, M. C. T.; WAGNER, M. L.; MICKELSON, J. R. Estimated prevalence of the type 1 Polysaccharide Storage Myopathy mutation in selected North American and European breeds. *Animal Genetics*. v. 41, s.2, p. 145-149, 2010.
- MCCUE, M. E.; ARMIÉN, A. G.; LUCIO, M.; MICKELSON, J. R.; VALBERG, S. J. Comparative skeletal muscle histopathologic and ultrastructural features in two forms of Polysaccharide Storage Myopathy in horses. *Veterinary Pathology*. v. 46, p. 1281-1291, 2009a.

- MCCUE, M. E.; RIBEIRO, W. P.; VALBERG, S. J. Prevalence of polysaccharide storage myopathy in horses with neuromuscular disorders. *Equine Veterinary Journal*. v. 36, p. 340-344, 2006.
- MCCUE, M. E.; VALBERG, S. J. Estimated prevalence of polysaccharide storage myopathy among overtly healthy Quarter Horses in the United States. *Journal of the American Veterinary Medical Association*. v. 231, n. 5, p. 746-750, 2007.
- MCCUE, M. E.; VALBERG, S. J.; JACKSON, M.; BORGIA, L.; LUCIO, M.; MICKELSON, J. R. Polysaccharide storage myopathy phenotype in quarter horse-related breeds is modified by the presence of an RYR1 mutation. *Neuromuscular Disorders*. v. 19, p.37-43, 2009b.
- MCCUE, M. E.; VALBERG, S. J.; LUCIO, M.; MICKELSON, J.R. Glycogen synthase 1 (GYS1) mutation in diverse breeds with Polysaccharide Storage Myopathy. *Journal of Veterinary Internal Medicine*. v. 22, p.1228-1233, 2008b.
- MCCUE, M. E.; VALBERG, S. J.; MILLER, M. B.; WADE, C.; DIMAURO, S.; AKMAN, H. O.; MICKELSON, J. R. Glycogen synthase (GYS1) mutation causes a novel skeletal muscle glycogenosis. *Genomics*. v. 91, p. 458-466, 2008a.
- MCGOWAN, C.M.; MCGOWAN, T. W.; PATTERSON-KANE, J. C. Prevalence of equine polysaccharide storage myopathy and others myopathy in two equine populations in the United Kingdom. *The Veterinary Journal*. v. 180, p. 330-336, 2009.
- MCWILLIAMS, S.; NELSON, T.; SUDO, R. T.; ZAPATA-SUDO, G.; BATTI, M.; SAMBUUGHIN, N. Novel skeletal muscle ryanodine receptor mutation in a large Brazilian family with malignant hyperthermia. *Clinical Genetics*. v. 62, p. 80-83, 2002.
- MEYER, T. S.; FEDDE, M. R.; COX, J. H.; ERICKSON, H. H. Hyperkalaemic periodic paralysis in horses: a review. *Equine Veterinary Journal*. v. 31, n. 5, p. 362-367, 1999.
- MOORE, J. Unmasking the fatal flaw. *Equus*, v. 185, n. 50, p. 80-85, 1993.
- MOTA, M. D.; OLIVEIRA, H. N.; VILLELA, L. C. V. Parâmetros genéticos para tempo em corridas de equinos da raça Quarto de Milha. In: *Anais do IV Simpósio Nacional de Melhoramento Animal*. 3p, 2002.

- NAYLOR, J. M. Equine hiperkalemic periodic paralysis: Review and implications. *Canadian Veterinary Journal*. v. 35, p. 279-285, 1994a.
- NAYLOR, J. M. Selection of Quarter Horse affected with hyperkalemic periodic paralysis by show judges . *Journal of the American Veterinary Research*. v. 204, n. 6, p. 926-928, 1994b.
- NAYLOR, J. M.; JONES, V.; BERRY, S. L. Clinical syndrome and diagnosis of hyperkalaemic periodic paralysis in quarter horses. *Equine Veterinary Journal*, v. 25, n. 3, p. 227-232, 1993.
- NAYLOR, J. M.; ROBINSON, J. A.; BERTONE, J. Familial incidence of hyperkalemic periodic paralysis in quarter horses. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, v. 200, n. 3, p. 340-343, 1992b.
- NAYLOR, J.; ROBINSON, J. A.; CRICHLLOW, E. C.; STEISS, J. E. Inheritance of Myotonic Discharges in American Quarter Horse and the relations to hyperkalemic periodic paralysis. *Canadian Journal of Veterinary Research*. v.56, p.62-66, 1992a.
- NAYLOR, R. J.; LIVESEY, L.; SCHUMACHER, J.; HENKE, N.; MASSEY, C.; BROCK, K. V.; FERNANDEZ FUENTES, M.; PIERCY, R. Allele copy number and underlying pathology are associated with subclinical severity in equine type 1 polysaccharide storage myopathy (PSSM1). *Plos One*. v. 7, n.7, e42317, 2012.
- NIETO, J. E.; ALEMAN, M. A rapid detection method for the ryanodine receptor 1 (C7360G) mutation in Quarter Horses. *Journal of Veterinary Internal Medicine*. v. 23, p. 619-622, 2009.
- O'BRIEN, P. J.; FORSYTH, G. W.; OLEXSON, D. W.; THATTE, H. S.; ADDIS, P. B. Canine malignant hyperthermia susceptibility: erythrocytic defects--osmotic fragility, glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency and abnormal Ca<sup>2+</sup> homeostasis. *Canadian Journal of Comparative Medicine*. v. 48, n. 4, p. 381-389, 1984.
- ORSINI, J.; DIVERS, T. *Manual of equine emergencies: treatment and procedures*. WB Saunders, 2003.
- PERTZ, C.; SUNDBERG, J. P. Malignant hyperthermia induced by etorphine and xylazine in a fallow deer. *Journal of the American Veterinary Medical Association*. v. 173, n.9, p. 1243-1243, 1978.

PICKAR, J. G.; SPIER, S. J.; SNYDER, J. R.; CARLSEN, R. C. Altered ionic permeability in skeletal muscle from horses with hyperkalemic periodic paralysis. *American Journal of Physiology*. v. 260, p. c926-c933, 1991.

QUIROZ-ROTHER, E.; RIVERO, J. L. Co-ordinated expression of contractile non-contractile features of control equine muscle fibre types characterized by immunostaining of myosin heavy chains. *Histochemistry and Cell Biology*. v. 116, n. 4, p. 299-312, 2001.

RADOSTITS, O.M.; GAY, C.C.; HINCLIFF, K.W.; CONSTABLE, P.D. *Veterinary Medicine: A textbook of the disease of cattle, sheep, goats, pigs and horses*. 10<sup>th</sup> ed. Saunders Elsevier, Edinburgh. 2007. 2065p.

RIBEIRO, W. P.; VALBERG, S. J.; PAGAN, J. D.; GUSTAVSSON, E. B. The effect of varying dietary starch and fat content on serum creatine kinase activity and substrate availability in equine Polysaccharide Storage Myopathy. *Journal of Veterinary Internal Medicine*. v. 18, p. 887-894, 2004.

RIOJAS-VALDÉS, V.; ZAMORA-ÁVILA, D. E.; HERNÁNDEZ-ESCAREÑO, J. J.; MARROQUÍN-CARDONA, A.; PICÓN-RUBIO, F. J.; VILLARREAL-VILLARREAL, J. P.; ÁVALOS-RAMÍREZ, R. Allele frequency of hyperkalemic periodic paralysis (HYPP) in quarter horses from Mexico. *African Journal of Biotechnology*. v. 13, n. 12, p. 1323-1326, 2014.

RIVERO, J. L.; TALMADJE, R. J.; EDGERTON, V. R. Myosin heavy chain isoforms in adult equine skeletal muscle: An immunohistochemical and electrophoretic study. *The Anatomical Record*. v. 246, p. 185-194, 1996.

ROBERTS, M. C.; MICKELSON, J. R.; PATTERSON, E. E.; NELSON, T. E.; ARMSTRONG, P. J.; BRUNSON, D. B.; HOGAN, K. Autosomal dominant canine malignant hyperthermia is caused by a mutation in the gene encoding the skeletal muscle calcium release channel (RYR1). *Anesthesiology*. v. 95, p. 716-725, 2001.

ROBINSON, J. A.; NAYLOR, J. M.; CRICHLAW, E. C. Use of electromyography for the diagnosis of equine hyperkalemic periodic paresis. *Canadian Journal of Veterinary Research*. v. 54, p. 495-500, 1990.

RUDOLPH, J. A.; SPIER, S. J.; BYRNS G.; ROJAS, C. V.; BERNOCO, D.; HOFFMAN, E. P. Periodic paralysis in Quarter Horses: A sodium channel mutation disseminated by selective breeding. *Nature Genetics*. v. 2, p. 144-147, 1992.

- SCHWARZ, B.; ERTL, R.; ZIMMER, S.; NETZMANN, Y.; KLEIN, D.; SCHWENDENWEIN, I.; HOVEN, R. V. Estimated prevalence of *GYS-1* mutation in healthy Austrian Haflingers. *Veterinary Records*. v.169, n. 22, p. 583, 2011.
- SÖDERQVIST, E.; SVANHOLM, C.; OLSEN, S. N.; LEIFSSON, P. S. Equine polysaccharide storage myopathy. *Dansk Veterinaertidsskrift*. v. 2, p. 26-31, 2013.
- SPIER, S. J. Hyperkalemic periodic paralysis: 14 years later. In: *AAEP Proceedings*. v. 52, p. 347-350, 2006.
- SPRAYBERRY, K. A.; MADIGAN, J.; LECOURTEUR, R. A.; VALENTINE, B. A. Renal failure, laminitis, and colitis following severe rhabdomyolysis in a draft horse-cross with polysaccharide storage myopathy. *The Canadian Veterinary Journal*. v. 39, p. 500-503, 1998.
- STANLEY, R. L.; MCCUE, M. E.; VALBERG, S. J.; MICKELSON, J. R.; MAYHEW, I. G.; MCGOWAN, C.; HAHN, C. N.; PATTERSON-KANE, J. C.; PIERCY, R. J. A glucogen synthase 1 mutation associated with equine polysaccharide storage myopathy and exertional rhabdomyolysis occurs in a variety of UK breeds. *Equine Veterinary Journal*. v. 41, n. 6, p. 597-601, 2009.
- STEELE, D. S.; NAYLOR, J. M. Hyperkalemic periodic paralysis, plasma lactate and exercise tolerance. *Journal of Equine Veterinary Science*. v. 16, n. 8, p. 327-333, 1996.
- STEISS, J. E.; NAYLOR, J. M. Episodic muscle tremors in a Quarter Horse: Resemblance to hyperkalemic periodic paralysis. *The Canadian Veterinary Journal*. v. 27, p. 332-335, 1986.
- TOBIN, J. R.; JASON, D. R.; CHALLA, V. R.; NELSON, T. E.; SAMBUUGHIN, N. Malignant hyperthermia and apparent heat stroke. *The Journal of the American Medical Association*. v. 286, n. 2, p. 168-169, 2001.
- TRYON, R. C.; PENEDO, M. C. T.; MCCUE, M. E.; MCCUE, M. E.; VALBERG, S. J.; MICKELSON, J. R.; FAMULA, T. R.; WAGNER, M. L.; JACKSON, M.; HAMILTON, M. J.; NOOTEBOOM, S.; BANNASCH, D. L. Evaluation of allele frequencies of inherited disease genes in subgroups of American Quarter Horses. *Journal of the American Veterinary Medical Association*. v. 234, p. 120-125, 2009.

- UENO, T.; OIKAWA, M.; KUWANO, A.; KASASHIMA, Y.; ISHIDA, N. Pathological findings of the skeletal muscles in a racehorse presenting with malignant hyperthermia-like symptoms after halothane anesthesia. *Journal of Equine Science*. v. 16, n. 3, p. 73-77, 2005.
- VALBERG, S. J. Polysaccharide Storage Myopathy. *In:Proceeding of the 52nd American Association of Equine Practitioners Convention*. 2006. p. 373-380, 2006.
- VALBERG, S. J.; CARDINET, G. H.; CARLSON, G. P.; DIMAURO, S. Polysaccharide storage myopathy associated with recurrent exertional rhabdomyolysis in horses. *Neuromuscular Disorders*. v. 2, n. 5, p. 351-359, 1992.
- VALBERG, S. J.; MACLEAY, J. M.; BILLSTROM, J. A.; HOWER-MORITZ, M. A.; MICKELSON J. R. Skeletal muscle metabolic response to exercise in horses with “tyning up” due to polysaccharide storage myopathy. *Equine Veterinary Journal*. v. 31, n.1, p. 43-47, 1999a.
- VALBERG, S. J.; MCCUE, M. E.; MICKELSON, J. R. The interplay of genetic, exercise, and nutrition in Polysaccharide Storage Myopathy. *Journal of Equine Veterinary Science*. v. 31, p. 205-210, 2011.
- VALBERG, S. J.; MICKELSON, J. R.; GALLANT, E. M.; MACLEAY, J. M.; LENTZ, L.; DE LA CORTE F. Exertional rhabdomyolysis in Quarter Horses and Thoroughbreds: one syndrome, multiple aetiologies. *Equine Veterinary Journal*. v. 30, p. 533-538, 1999b.
- VALENTINE, B. A.; CREDILLE, K. M.; LAVOIE, J. P.; FATONE, S.; GUARD, C.; CUMMINGS, J. F.; COOPER, B. J. Severe Polysaccharide Storage Myopathy in Belgian and Percheron draught horses. *Equine Veterinary Journal*. v. 29, n. 3, p. 220-225, 1997.
- VALENTINE, B. A.; DIVERS, T. J.; MURPHY, D. J.; TODHUNTER, P. G. Muscle biopsy diagnosis of equine motor neuron disease and equine Polysaccharide Storage Myopathy. *Equine Veterinary Education*. v. 10, n. 1, p. 42-50, 1998.
- VALENTINE, B. A.; HABECKER, P. L.; PATTERSON, J. S.; NJAA, B. L.; SHAPIRO, J.; HOLSHUH, H. J.; BILDFELL, R. J.; BIRD, K. E. Incidence of polysaccharide storage myopathy in draft horse-related breeds: a necropsy

study of 37 horses and mule. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*. v. 13, p. 63-68, 2001b.

VALENTINE, B. A.; MCDONOUGH, S. P.; CHANG, Y. F.; VONDERCHEK, A. J. Polysaccharide storage myopathy in Morgan, Arabian, and Stabdarbread Related horses and Wesh-cross Ponies. *Veterinary Pathology*. v. 37, p. 193-196, 2000.

VALENTINE, B. A.; VAN SAUN, R. J.; THOMPSON, K. N.; HINTZ, H. F. Role of dietary carbohydrate and fat in horses with equine Polysaccharide Storage Myopathy. *Journal of the American Veterinary Medical Association*. v. 219, n. 11, p. 1537-1544, 2001a.

VOTION, D. M. The story of equine atypical myopathy: A review from the beginning to a possible end. *ISRN Veterinary Science*. v. 2012, 2012.

WARD, T. L.; VALBERG, S. J.; ADELSON, D. L.; ABBEY, C. A.; BINNS, M. M.; MICKELSON, J. R. Glycogen branching enzyme (GBE1) mutation causing equine glycogen storage disease IV. *Mammalian Genome*. v. 15, p. 570-577, 2004.

ZORDAN, P. A. L. *Levantamento da frequência da alelo mutante causador da paralisia periódica hipercalêmica (HYPP) em cavalos da raça Quarto de Milha*. 2000. 26p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Universidade Federal de Minas Gerais – Escola de Veterinária, Belo Horizonte.

*ANEXOS*

*“PESQUISA VETERINÁRIA BRASILEIRA”*

*(NORMAS)*

## INSTRUÇÕES AOS AUTORES

Os trabalhos para submissão devem ser enviados por via eletrônica, através do e-mail <jurgen.dobereiner@terra.com.br>, com os arquivos de texto na versão mais recente do Word. Havendo necessidade (por causa de figuras “pesadas”), podem ser enviados em CD pelo correio, com uma via impressa, ao Dr. Jürgen Döbereiner, Revista PESQUISA VETERINÁRIA BRASILEIRA, Caixa Postal 74.591, Seropédica, RJ 23890-000. Devem constituir-se de resultados de pesquisa ainda não publicados e não considerados para publicação em outra revista.

**Para abreviar sua tramitação e aceitação, os trabalhos sempre devem ser submetidos conforme as normas de apresentação da revista ([www.pvb.com.br](http://www.pvb.com.br)) e o modelo em Word (PDF no site). Os originais submetidos fora das normas de apresentação, serão devolvidos aos autores para a devida adequação.**

Apesar de não serem aceitas comunicações (*Short communications*) sob forma de “Notas Científicas”, não há limite mínimo do número de páginas do trabalho enviado, que deve, porém, conter pormenores suficientes sobre os experimentos ou a metodologia empregada no estudo. Trabalhos sobre Anestesiologia e Cirurgia serão recebidos para submissão somente os da área de Animais Selvagens.

Embora sejam de responsabilidade dos autores as opiniões e conceitos emitidos nos trabalhos, o Conselho Editorial, com a assistência da Assessoria Científica, reserva-se o direito de sugerir ou solicitar modificações aconselháveis ou necessárias. Os trabalhos submetidos são aceitos através da aprovação pelos pares (*peer review*).

**NOTE: Em complementação aos recursos para edição da revista (impressa e online) e distribuição via correio é cobrada taxa de publicação (*page charge*) no valor de R\$ 250,00 por página editorada e impressa, na ocasião do envio da prova final, ao autor para correspondência.**

**1. Os trabalhos devem ser organizados, sempre que possível, em Título, ABSTRACT, RESUMO, INTRODUÇÃO, MATERIAL E MÉTODOS, RESULTADOS, DISCUSSÃO, CONCLUSÕES** (ou combinação destes dois últimos), **Agradecimentos e REFERÊNCIAS:**

a) o **Título** do artigo deve ser conciso e indicar o conteúdo do trabalho; pormenores de identificação científica devem ser colocados em MATERIAL E MÉTODOS.

b) O(s) **Autor(es)** deve(m) sistematicamente encurtar os nomes, tanto para facilitar sua identificação científica, como para as citações bibliográficas. Em muitos casos isto significa manter o primeiro nome e o último sobrenome e abreviar os demais sobrenomes: Paulo Fernando de Vargas Peixoto escreve Paulo V. Peixoto ou Peixoto P.V.; Franklin Riet-Correa Amaral escreve Franklin Riet-Correa ou Riet- Correa F.; Silvana Maria Medeiros de Sousa Silva poderia usar Silvana M.M.S. Silva, inverso Silva S.M.M.S., ou Silvana M.M. Sousa-Silva, inverso, Sousa-Silva S.M.M., ou mais curto, Silvana M. Medeiros-Silva, e inverso, Medeiros-Silva S.M.; para facilitar, inclusive, a moderna indexação, recomenda-se que os trabalhos tenham o máximo de 8 autores;

c) o **ABSTRACT** deverá ser apresentado com os elementos constituintes do RESUMO em português, podendo ser mais explicativos para estrangeiros. Ambos devem ser seguidos de “INDEX TERMS” ou “TERMOS DE INDEXAÇÃO”, respectivamente;

d) o **RESUMO** deve apresentar, de forma direta e no passado, o que foi feito e estudado, indicando a metodologia e dando os mais importantes resultados e conclusões. Nos trabalhos em inglês, o título em português deve constar em negrito e entre colchetes, logo após a palavra RESUMO;

e) a **INTRODUÇÃO** deve ser breve, com citação bibliográfica específica sem que a mesma assuma importância principal, e finalizar com a indicação do objetivo do trabalho;

f) em **MATERIAL E MÉTODOS** devem ser reunidos os dados que permitam a repetição do trabalho por outros pesquisadores. Na experimentação com animais, deve constar a aprovação do projeto pela Comissão de Ética local;

g) em **RESULTADOS** deve ser feita a apresentação concisa dos dados obtidos. Quadros devem ser preparados sem dados supérfluos, apresentando, sempre que indicado, médias de várias repetições. É conveniente, às vezes,

expressar dados complexos por gráficos (Figuras), ao invés de apresentá-los em Quadros extensos;

h) na **DISCUSSÃO** devem ser discutidos os resultados diante da literatura. Não convém mencionar trabalhos em desenvolvimento ou planos futuros, de modo a evitar uma obrigação do autor e da revista de publicá-los;

i) as **CONCLUSÕES** devem basear-se somente nos resultados apresentados no trabalho;

j) Agradecimentos devem ser sucintos e não devem aparecer no texto ou em notas de rodapé;

k) a Lista de **REFERÊNCIAS**, que só incluirá a bibliografia citada no trabalho e a que tenha servido como fonte para consulta indireta, deverá ser ordenada alfabeticamente pelo sobrenome do primeiro autor, registrando-se os nomes de todos os autores, em caixa alta e baixa (colocando as referências em ordem cronológica quando houver mais de dois autores), o título de cada publicação e, abreviado ou por extenso (se tiver dúvida), o nome da revista ou obra, usando as instruções do “Style Manual for Biological Journals” (American Institute for Biological Sciences), o “Bibliographic Guide for Editors and Authors” (American Chemical Society, Washington, DC) e exemplos de fascículos já publicados ([www.pvb.com.br](http://www.pvb.com.br)).

## **2. Na elaboração do texto deverão ser atendidas as seguintes normas:**

a) os trabalhos devem ser submetidos **segundo o exemplo de apresentação de fascículos recentes da revista e do modelo constante do site sob “Instruções aos Autores” ([www.pvb.com.br](http://www.pvb.com.br))**. A digitalização deve ser na fonte **Cambria, corpo 10, entrelinha simples; a página deve ser no formato A4, com 2cm de margens** (superior, inferior, esquerda e direita), o texto deve ser corrido e não deve ser formatado em duas colunas, com as legendas das figuras e os Quadros no final (logo após as REFERÊNCIAS). As Figuras (inclusive gráficos) devem ter seus arquivos fornecidos separados do texto. Quando incluídos no texto do trabalho, devem ser introduzidos através da ferramenta “Inserir” do Word; pois imagens copiadas e coladas perdem as informações do programa onde foram geradas, resultando, sempre, em má qualidade;

b) a redação dos trabalhos deve ser concisa, com a linguagem, tanto quanto possível, no passado e impessoal; no texto, os sinais de chamada para notas

de rodapé serão números arábicos colocados em sobrescrito após a palavra ou frase que motivou a nota. Essa numeração será contínua por todo o trabalho; as notas serão lançadas ao pé da página em que estiver o respectivo sinal de chamada. Todos os Quadros e todas as Figuras serão mencionados no texto. Estas remissões serão feitas pelos respectivos números e, sempre que possível, na ordem crescente destes. ABSTRACT e RESUMO serão escritos corridamente em um só parágrafo e não deverão conter citações bibliográficas.

c) **no rodapé da primeira página deverá constar endereço profissional completo de todos os autores e o e-mail do autor para correspondência, bem como e-mails dos demais autores (para eventualidades e confirmação de endereço para envio do fascículo impresso);**

d) siglas e abreviações dos nomes de instituições, ao aparecerem pela primeira vez no trabalho, serão colocadas entre parênteses e precedidas do nome por extenso;

e) citações bibliográficas serão feitas pelo sistema “autor e ano”; trabalhos de até três autores serão citados pelos nomes dos três, e com mais de três, pelo nome do primeiro, seguido de “et al.”, mais o ano; se dois trabalhos não se distinguirem por esses elementos, a diferenciação será feita através do acréscimo de letras minúsculas ao ano, em ambos. **Trabalhos não consultados na íntegra pelo(s) autor(es), devem ser diferenciados, colocando-se no final da respectiva referência, “(Resumo)” ou “(Apud Fulano e o ano.)”;** a referência do trabalho que serviu de fonte, será **incluída na lista uma só vez.** A menção de comunicação pessoal e de dados não publicados é feita no texto somente com citação de Nome e Ano, colocando-se na lista das Referências dados adicionais, como a Instituição de origem do(s) autor(es). Nas citações de trabalhos colocados entre parênteses, **não se usará vírgula entre o nome do autor e o ano, nem ponto-e-vírgula após cada ano;** a separação entre trabalhos, nesse caso, se fará apenas por vírgulas, exemplo: (Christian & Tryphonas 1971, Priester & Haves 1974, Lemos et al. 2004, Krametter Froetcher et. al. 2007);

f) a Lista das **REFERÊNCIAS** deverá ser apresentada **isenta do uso de caixa alta**, com os nomes científicos em itálico (grifo), **e sempre em conformidade com o padrão adotado nos últimos fascículos da revista**, inclusive quanto à ordenação de seus vários elementos.

3. **As Figuras** (gráficos, desenhos, mapas ou fotografias) **originais devem ser preferencialmente enviadas por via eletrônica**. Quando as fotos forem obtidas através de câmeras digitais (com extensão “jpg”), os arquivos deverão ser enviados como obtidos (sem tratamento ou alterações). Quando obtidas em papel ou outro suporte, deverão ser anexadas ao trabalho, mesmo se escaneadas pelo autor. Nesse caso, cada Figura será identificada na margem ou no verso, a traço leve de lápis, pelo respectivo número e o nome do autor; havendo possibilidade de dúvida, deve ser indicada a parte inferior da figura pela palavra “pé”. Os gráficos devem ser produzidos em 2D, com colunas em branco, cinza e preto, sem fundo e sem linhas. A chave das convenções adotadas será incluída preferentemente, na área da Figura; evitarse- á o uso de título ao alto da figura. Fotografias deverão ser apresentadas preferentemente em preto e branco, em papel brilhante, ou em diapositivos (“slides”). Para evitar danos por grampos, desenhos e fotografias deverão ser colocados em envelope. Na versão online, fotos e gráficos poderão ser publicados em cores; na versão impressa, somente quando a cor for elemento primordial a impressão das figuras poderá ser em cores.

4. As **legendas explicativas das Figuras** conterão informações suficientes para que estas sejam compreensíveis, (até certo ponto autoexplicativas, com independência do texto) e **serão apresentadas no final do trabalho**.

5. Os **Quadros deverão ser** explicativos por si mesmos e **colocados no final do texto**. Cada um terá seu título completo e será caracterizado por dois traços longos, um acima e outro abaixo do cabeçalho das colunas; entre esses dois traços poderá haver outros mais curtos, para grupamento de colunas. **Não há traços verticais. Os sinais de chamada serão alfabéticos, recomeçando, se possível, com “a” em cada Quadro**; as notas serão lançadas logo abaixo do Quadro respectivo, do qual serão separadas por um traço curto à esquerda.

*“CIÊNCIA RURAL”*

*(NORMAS)*

**1. CIÊNCIA RURAL** - Revista Científica do Centro de Ciências Rurais da Universidade Federal de Santa Maria publica artigos científicos, revisões bibliográficas e notas referentes à área de Ciências Agrárias, que deverão ser destinados com exclusividade.

**2. Os artigos científicos, revisões e notas** devem ser encaminhados via eletrônica e editados em idioma Português ou Inglês. Todas as linhas deverão ser numeradas e paginadas no lado inferior direito. O trabalho deverá ser digitado em tamanho A4 210 x 297mm com, no máximo, 25 linhas por página em espaço duplo, com margens superior, inferior, esquerda e direita em 2,5cm, fonte Times New Roman e tamanho 12. **O máximo de páginas será 15 para artigo científico, 20 para revisão bibliográfica e 8 para nota, incluindo tabelas, gráficos e figuras.** Figuras, gráficos e tabelas devem ser disponibilizados ao final do texto e individualmente por página, sendo que **não poderão ultrapassar as margens e nem estar com apresentação paisagem.**

**3. O artigo científico** (Modelo .doc, .pdf) **deverá conter os seguintes tópicos:** Título (Português e Inglês); Resumo; Palavras-chave; Abstract; Key words; Introdução com Revisão de Literatura; Material e Métodos; Resultados e Discussão; Conclusão e Referências; Agradecimento(s) e Apresentação; Fontes de Aquisição; Informe Verbal; Comitê de Ética e Biossegurança devem aparecer antes das referências. **Pesquisa envolvendo seres humanos e animais obrigatoriamente devem apresentar parecer de aprovação de um comitê de ética institucional já na submissão.** Alternativamente pode ser enviado um dos modelos ao lado (Declaração Modelo Humano, Declaração Modelo Animal).

**4. A revisão bibliográfica** (Modelo .doc, .pdf) **deverá conter os seguintes tópicos:** Título (Português e Inglês); Resumo; Palavras-chave; Abstract; Key words; Introdução; Desenvolvimento; Conclusão; e Referências. Agradecimento(s) e Apresentação; Fontes de Aquisição e Informe Verbal; Comitê de Ética e Biossegurança devem aparecer antes das referências. **Pesquisa envolvendo seres humanos e animais obrigatoriamente devem apresentar parecer de aprovação de um comitê de ética institucional já na submissão.** Alternativamente pode ser enviado

um dos modelos ao lado (Declaração Modelo Humano, Declaração Modelo Animal).

**5. A nota** (Modelo .doc, .pdf) **deverá conter os seguintes tópicos:** Título (Português e Inglês); Resumo; Palavras-chave; Abstract; Key words; Texto (sem subdivisão, porém com introdução; metodologia; resultados e discussão e conclusão; podendo conter tabelas ou figuras); Referências. Agradecimento(s) e Apresentação; Fontes de Aquisição e Informe Verbal; Comitê de Ética e Biossegurança devem aparecer antes das referências. **Pesquisa envolvendo seres humanos e animais obrigatoriamente devem apresentar parecer de aprovação de um comitê de ética institucional já na submissão.** Alternativamente pode ser enviado um dos modelos ao lado (Declaração Modelo Humano, Declaração Modelo Animal).

**6.** Não serão fornecidas separatas. Os artigos encontram-se disponíveis no formato pdf no endereço eletrônico da revista [www.scielo.br/cr](http://www.scielo.br/cr).

**7.** Descrever o título em português e inglês (caso o artigo seja em português) - inglês e português (caso o artigo seja em inglês). Somente a primeira letra do título do artigo deve ser maiúscula exceto no caso de nomes próprios. Evitar abreviaturas e nomes científicos no título. O nome científico só deve ser empregado quando estritamente necessário. Esses devem aparecer nas palavras-chave, resumo e demais seções quando necessários.

**8.** As citações dos autores, no texto, deverão ser feitas com letras maiúsculas seguidas do ano de publicação, conforme exemplos: Esses resultados estão de acordo com os reportados por MILLER & KIPLINGER (1966) e LEE et al. (1996), como uma má formação congênita (MOULTON, 1978).

**9.** As Referências deverão ser efetuadas no estilo ABNT (NBR 6023/2000) conforme normas próprias da revista.

**9.1.** Citação de livro:  
JENNINGS, P.B. **The practice of large animal surgery**. Philadelphia : Saunders, 1985. 2v.

TOKARNIA, C.H. et al. (Mais de dois autores) **Plantas tóxicas da Amazônia a bovinos e outros herbívoros**. Manaus : INPA, 1979. 95p.

**9.2.** Capítulo de livro com autoria:  
GORBAMAN, A. A comparative pathology of thyroid. In: HAZARD, J.B.; SMITH, D.E. **The thyroid**. Baltimore : Williams & Wilkins, 1964. Cap.2, p.32-48.

**9.3.** Capítulo de livro sem autoria:  
 COCHRAN, W.C. The estimation of sample size. In: \_\_\_\_\_. **Sampling techniques**. 3.ed. New York : John Willey, 1977. Cap.4, p.72-90.  
 TURNER, A.S.; McILWRAITH, C.W. Fluidoterapia. In: \_\_\_\_\_. **Técnicas cirúrgicas em animais de grande porte**. São Paulo : Roca, 1985. p.29-40.

**9.4.** Artigo completo:

O autor deverá acrescentar a url para o artigo referenciado e o número de identificação DOI (Digital Object Identifiers), conforme exemplos abaixo:

MEWIS, I.; ULRICH, CH. Action of amorphous diatomaceous earth against different stages of the stored product pests *Tribolium confusum* (Coleoptera: Tenebrionidae), *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae), *Sitophilus granarius* (Coleoptera: Curculionidae) and *Plodia interpunctella* (Lepidoptera: Pyralidae). **Journal of Stored Product Research**, Amsterdam (Cidade opcional), v.37, p.153-164, 2001. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/S0022-474X\(00\)00016-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0022-474X(00)00016-3)>. Acesso em: 20 nov. 2008. doi: 10.1016/S0022-474X(00)00016-3.

PINTO JUNIOR, A.R. et al (Mais de 2 autores). Resposta de *Sitophilus oryzae* (L.), *Cryptolestes ferrugineus* (Stephens) e *Oryzaephilus surinamensis* (L.) a diferentes concentrações de terra de diatomácea em trigo armazenado a granel. **Ciência Rural**, Santa Maria (Cidade opcional), v. 38, n. 8, p.2103-2108, nov. 2008. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0103-84782008000800002&lng=pt&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-84782008000800002&lng=pt&nrm=iso)>. Acesso em: 25 nov. 2008. doi: 10.1590/S0103-84782008000800002.

**9.5.** Resumos:

RIZZARDI, M.A.; MILGIORANÇA, M.E. Avaliação de cultivares do ensaio nacional de girassol, Passo Fundo, RS, 1991/92. In: JORNADA DE PESQUISA DA UFSM, 1., 1992, Santa Maria, RS. **Anais...** Santa Maria : Pró-reitoria de Pós-graduação e Pesquisa, 1992. V.1. 420p. p.236.

**9.6.** Tese, dissertação:

COSTA, J.M.B. **Estudo comparativo de algumas características digestivas entre bovinos (Charolês) e bubalinos (Jafarabad)**. 1986. 132f. Monografia/Dissertação/Tese (Especialização/ Mestrado/Doutorado em

Zootecnia) - Curso de Pós-graduação em Zootecnia, Universidade Federal de Santa Maria.

#### 9.7. Boletim:

ROGIK, F.A. **Indústria da lactose**. São Paulo : Departamento de Produção Animal, 1942. 20p. (Boletim Técnico, 20).

#### 9.8. Informação

verbal:

Identificada no próprio texto logo após a informação, através da expressão entre parênteses. Exemplo: ... são achados descritos por Vieira (1991 - Informe verbal). Ao final do texto, antes das Referências Bibliográficas, citar o endereço completo do autor (incluir E-mail), e/ou local, evento, data e tipo de apresentação na qual foi emitida a informação.

#### 9.9. Documentos

eletrônicos:

MATERA, J.M. **Afecções cirúrgicas da coluna vertebral: análise sobre as possibilidades do tratamento cirúrgico**. São Paulo : Departamento de Cirurgia, FMVZ-USP, 1997. 1 CD.

GRIFON, D.M. Arthroscopic diagnosis of elbow displasia. In: WORLD SMALL ANIMAL VETERINARY CONGRESS, 31., 2006, Prague, Czech Republic. **Proceedings...** Prague: WSAVA, 2006. p.630-636. Acessado em 12 fev. 2007. Online. Disponível em: <http://www.ivis.org/proceedings/wsava/2006/lecture22/Griffon1.pdf?LA=1>

UFRGS. **Transgênicos**. Zero Hora Digital, Porto Alegre, 23 mar. 2000. Especiais. Acessado em 23 mar. 2000. Online. Disponível em: <http://www.zh.com.br/especial/index.htm>

ONGPHIPHADHANAKUL, B. Prevention of postmenopausal bone loss by low and conventional doses of calcitriol or conjugated equine estrogen. **Maturitas**, (Ireland), v.34, n.2, p.179-184, Feb 15, 2000. Obtido via base de dados MEDLINE. 1994-2000. Acessado em 23 mar. 2000. Online. Disponível em: <http://www.Medscape.com/server-java/MedlineSearchForm>

MARCHIONATTI, A.; PIPPI, N.L. Análise comparativa entre duas técnicas de recuperação de úlcera de córnea não infectada em nível de estroma médio. In: SEMINARIO LATINOAMERICANO DE CIRURGIA VETERINÁRIA, 3., 1997, Corrientes, Argentina. **Anais...** Corrientes : Facultad de Ciencias Veterinarias - UNNE, 1997. Disquete. 1 disquete de 31/2. Para uso em PC.

**10.** Desenhos, gráficos e fotografias serão denominados figuras e terão o número de ordem em algarismos arábicos. A revista não usa a denominação quadro. As figuras devem ser disponibilizadas individualmente por página. Os desenhos figuras e gráficos (com largura de no máximo 16cm) devem ser feitos em editor gráfico sempre em qualidade máxima com pelo menos 300 dpi em extensão .tiff. As tabelas devem conter a palavra tabela, seguida do número de ordem em algarismo arábico e não devem exceder uma lauda.

**11.** Os conceitos e afirmações contidos nos artigos serão de inteira responsabilidade do(s) autor(es).

**12.** Será obrigatório o cadastro de todos autores nos metadados de submissão. O artigo não tramitará enquanto o referido item não for atendido. Excepcionalmente, mediante consulta prévia para a Comissão Editorial outro expediente poderá ser utilizado.

**13.** Lista de verificação (Checklist .doc, .pdf).

**14.** Os artigos serão publicados em ordem de aprovação.

**15.** Os artigos não aprovados serão arquivados havendo, no entanto, o encaminhamento de uma justificativa pelo indeferimento.

**16.** Em caso de dúvida, consultar artigos de fascículos já publicados antes de dirigir-se à Comissão Editorial.