

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”  
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA  
CAMPUS DE BOTUCATU**

**FREQUÊNCIA ALÉLICA DA DELEÇÃO NO GENE *POMC*  
RESPONSÁVEL PELA OBESIDADE EM CÃES DA RAÇA  
LABRADOR RETRIEVER NO BRASIL**

**NATÁLIA DE OLIVEIRA LOURENÇO**

**Botucatu, SP**

**Maio de 2019**

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”  
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA  
CAMPUS DE BOTUCATU**

**FREQUÊNCIA ALÉLICA DA DELEÇÃO NO GENE *POMC*  
RESPONSÁVEL PELA OBESIDADE EM CÃES DA RAÇA  
LABRADOR RETRIEVER NO BRASIL**

**NATÁLIA DE OLIVEIRA LOURENÇO**

Dissertação apresentada no Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária para obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. José Paes de Oliveira Filho

Co-orientadora: Profa. Dra. Alessandra Melchert

**Botucatu, SP**

**Mai de 2019**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.  
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP  
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSANGELA APARECIDA LOBO-CRB 8/7500

Lourenço, Natália de Oliveira.

Frequência alélica da deleção no gene *POMC* responsável pela obesidade em cães da raça Labrador Retriever no Brasil / Natália de Oliveira Lourenço. - Botucatu, 2019

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

Orientador: José Paes de Oliveira Filho

Coorientador: Alessandra Melchert

Capes: 50501062

1. Mutação. 2. Cães. 3. Obesidade. 4. Prevalência. 5. Brasil.

Palavras-chave: Brasil; cão; mutação; obesidade; prevalência.

Nome do autor: Natália de Oliveira Lourenço

Título: FREQUÊNCIA ALÉLICA DA DELEÇÃO NO GENE *POMC*  
RESPONSÁVEL PELA OBESIDADE EM CÃES DA RAÇA LABRADOR  
RETRIEVER NO BRASIL

### COMISSÃO EXAMINADORA

---

Prof. Dr. José Paes de Oliveira Filho  
Orientador  
Departamento de Clínica Veterinária  
FMVZ – UNESP – Botucatu

---

Prof. Dr. Luiz Henrique de Araújo Machado  
Membro  
Departamento de Clínica Veterinária  
FMVZ – UNESP – Botucatu

---

Profa. Dra. Mariana Isa Poci Palumbo  
Membro  
Departamento de Clínica Veterinária  
FMEZ/UFMS – Campo Grande - MS

Data da defesa: 28 de Maio de 2019.

## **AGRADECIMENTOS**

À minha família, principalmente aos meus pais Maria Fernanda Morais de Oliveira Lourenço e Gilmar Lourenço, minha irmã Milena de Oliveira Lourenço e minha sobrinha Luíza Lourenço Madrid por tornar tudo isso possível com toda a ajuda e incentivo.

Ao professor e orientador José Paes de Oliveira Filho por toda a paciência, apoio e aprendizado.

Ao meu namorado Enrico Ravizzini Lima Salles pelo amor, parceria e incentivo sempre.

À minha equipe de trabalho, Priscilla Cabral, Caio Kalil, Vanessa Brissi, Lucas Rossi e, em especial, à minha gerente e amiga Tauji Orra pela compreensão durante toda essa jornada.

À amiga Raíssa Oliveira Leite que o mestrado me presenteou e sempre me ajudou de tantas formas.

Aos meus amigos de UNESP Mariana Carvalho, Gustavo Rosa, Igor Vellano pela amizade e parceria diárias.

À Ana Luísa Holanda de Albuquerque, Roberta Martins Basso e Anelize de Souza Trecenti que, com a ajuda e contribuição direta, foram essenciais para a realização deste trabalho.

Aos amigos de pós-graduação Larissa Rocha Andrade, Danilo Giorgi Abranches de Andrade, Campo Amor Vieira da Cunha Neto, César Erineudo Tavares de Araújo, por todo o aprendizado e troca.

Às minhas amigas Amanda Campos, Amanda Dela, Mayne Koike, Ingra Morales e Patrícia Fonseca pela amizade e por estarem sempre ao meu lado me incentivando.

À Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia de Botucatu – UNESP,  
pelo apoio da instituição para o desenvolvimento da dissertação.

A todos que contribuíram para que esse trabalho pudesse ser concluído,  
em especial, meus familiares e orientador.

## LISTA DE TABELAS

### CAPÍTULO I

Tabela 1 – Taxas de incidência de obesidade em populações de cães . . . . . 7

Tabela 2 – Resumo dos principais fatores de risco para a obesidade em  
cães..... 9

Tabela 3 – Número de Labradores Retrievers registrados no Brasil de 2010 a  
2017..... 12

### CAPÍTULO II

Table 1 - Genotype prevalence, allele frequency, and Hardy-Weinberg analysis  
of the deletion *POMC\_P187fs* in Labrador retrievers dogs. . . . . 28

## LISTA DE FIGURAS

### CAPÍTULO II

Figure 1 - Partial chromatogram showing capillary sequencing results from wild-type (A), homozygous deletion (B), and heterozygous (C) Labrador retriever dogs. It is possible to observe in "A" the 14 bp (AGGGCCCGGCCGCG) of the deletion *POMC\_P187fs* (underlined), while at "B" these 14 bases are absent. The double peaks may be observed in "C" from the beginning of the deletion *POMC\_P187fs*, ie, the 14 bp are only deleted in one allele. Image obtained in the Geneious® 10.0.9 software (Biomatters Ltd, Auckland, New Zealand).....28



# Sumário

RESUMO .....	1
ABSTRACT .....	2
CAPITULO I .....	3
1.INTRODUÇÃO .....	4
2. REVISÃO DE LITERATURA .....	5
2.1 Obesidade em humanos .....	5
2.2 Obesidade em cães .....	6
2.3 A raça Labrador Retriever .....	11
3.OBJETIVOS .....	13
4.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	14
CAPÍTULO II .....	21
TRABALHO CIENTÍFICO.....	22
NORMAS DE SUBMISSÃO: INSTRUÇÕES AOS AUTORES.....	29

LOURENÇO, N. O. **Frequência alélica da deleção no gene *POMC* responsável pela obesidade em cães da raça Labrador Retriever no Brasil.** Botucatu – SP, 2019, 48P. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu.

## **RESUMO**

O Labrador Retriever (LR) é uma das principais raças caninas com maior predisposição à obesidade. Vários fatores, especialmente as inter-relações entre a alimentação, exercício e fatores sociais, influenciam a probabilidade de um cão se tornar obeso. Além disso, fatores genéticos são também responsáveis pela obesidade em cães, e no LR a mutação P187fs no gene pró-opiomelanocortina (*POMC*) está fortemente associada à obesidade. Não existem estudos prévios de prevalência da desta em LR no Brasil. Portanto, o objetivo deste estudo foi investigar esta mutação em cães da raça LR no Brasil. Dos 108 LR avaliados neste estudo, 59 eram de um estudo retrospectivo (composto por animais atendido no hospital veterinário e sem linhagem conhecida) e 49 eram de um estudo prospectivo (composto por 19 cães pet e 30 cães de assistência/resgate). Um questionário de risco de obesidade modificado foi aplicado nos tutores dos animais usados no estudo prospectivo. Fragmentos de DNA, contendo a região mutada, foram amplificados por PCR e submetidos ao sequenciamento gênico direto. A frequência alélica da mutação (21,3%) estava fora do equilíbrio de Hardy-Weinberg ( $P < 0,05$ ). Usando somente os dados dos animais de linhagem conhecida, o alelo mutado foi mais frequente no grupo de assistência/resgate que no grupo de pets ( $P < 0,01$ ). Embora a mutação tenha aumentado a motivação pelo alimento em LR do grupo de assistência/resgate, outras variáveis, especialmente o frequente exercício, favoreceu a manutenção o peso corporal ideal. O desequilíbrio de Hardy-Weinberg observado na distribuição do alelo mutado observado neste estudo, independentemente do grupo de LR, sugere a possibilidade de uma seleção positiva para este alelo, o qual poderá levar a manutenção desse alelo deletério nesta população.

**Palavras chave:** mutação, cão, obesidade, prevalência, Brasil.

LOURENÇO, N. O. **Allelic frequency from *POMC* gene deletion responsible for obesity in Labrador Retrievers dogs in Brazil.** Botucatu – SP, 2019. 48P. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu.

## **ABSTRACT**

The Labrador retriever (LR) is among the main breeds with the greatest predisposition to obesity. Several factors; especially the interrelationships between food management, exercise and social factors; influence the likelihood of a dog becoming obese. Furthermore, genetic factors are also responsible for obesity in dogs, and in LR, the mutation P187fs in pro-opiomelanocortin (*POMC*) gene is strongly associated with obesity. There is no knowledge of studies that have previously evaluated the prevalence of this mutation in Brazilian LR. Therefore, the objective of this study was to investigate this mutation in LR in Brazil. Of the 108 LR that were assessed in this study, 59 were from a previous study, composed by animals assisted in a veterinary hospital with unknown lineage, and 49 were from a prospective study, composed of 19 pet and 30 assistance/rescue LR dogs. The obesity risk and appetite questionnaire were applied, with some modifications, to tutors of the animals used in the prospective study. Fragments of the DNA, containing the mutated region, were amplified by PCR and submitted to direct gene sequencing. The mutated allele frequency (21.3%) was out of Hardy-Weinberg Equilibrium (HWE) ( $P < 0.05$ ). Using only the data of animals with known lineage, the presence of the mutated allele was higher in the assistance/rescue dogs than pets ( $P < 0.01$ ). Although the mutation has increased the food-motivation in the assistance/rescue dogs, other variables, especially frequent exercising, favored that these animals maintained the ideal body weight. In summary, the Hardy-Weinberg disequilibrium observed in the mutated allele distribution in this study, independently of the LR group assessed, suggesting the possibility of positive selection of the mutated allele, which may lead to the maintenance of this deleterious allele in this population.

**Keywords:** mutation, dog, obesity, prevalence, Brazil.

## *CAPITULO I*

## 1. Introdução

A obesidade tem como definição o acúmulo de gordura corporal que, em excesso, prejudica diversas funções fisiológicas do organismo. Animais obesos têm redução da qualidade de vida e longevidade, além de diversos prejuízos à saúde, como o desenvolvimento de diabetes mellitus, alterações cardiovasculares e musculoesqueléticas, prejuízo na imunocompetência e redução da expectativa de vida (Robertson, 2003).

Apesar de ser uma doença nutricional, a obesidade possui caráter multifatorial, tendo como principais fatores: sociais, culturais, metabólicos, endócrinos e genéticos. Sabe-se que cães da raça Labrador Retriever estão entre as principais raças com maior predisposição à obesidade no Brasil (Jericó e Scheffer, 2002; Colliard et al., 2006; Courcier et al., 2010) e, dentre os fatores genéticos, cães desta raça podem apresentar a deleção (p.E188fs) de 14 pares de bases no éxon 3 do gene pró-opiomelanocortina (*POMC*), responsável pela codificação dos peptídeos neuroativos  $\beta$ -MSH e  $\beta$ -endorfina (Raffan et al., 2016).

Embora o papel da  $\beta$ -endorfina na regulação do apetite, balanço energético e saciedade não terem sido completamente elucidados, é provável que a  $\beta$ -endorfina tenha relação com a recompensa oro-sensorial (Mendez et al., 2015).

A presença desta deleção levará a aumento da adiposidade e peso corporal e do apetite de Labradores Retrievers, sobretudo, quando em homozigose (Raffan et al., 2016). Além disso, Raffan e colaboradores também perceberam que a mutação é significativamente mais comum em Labradores Retrievers selecionados para serem animais de assistência, principalmente pelo fato de que estes animais são selecionados justamente pelo temperamento e “treinabilidade” e o “reforço positivo”, em que a recompensa alimentar é a principal tática de adestramento em filhotes.

Uma vez que não se tem conhecimento de estudos que tenham avaliado previamente a prevalência desta mutação em Labradores Retrievers no Brasil, o presente estudo visa estimar a prevalência da mutação no gene *POMC* (p.E188fs), responsável pela obesidade em Labradores Retrievers no Brasil.

## 2. Revisão de literatura

### 2.1 Obesidade em humanos

A obesidade é um problema de saúde pública em todo o mundo há décadas, vindo a ser considerada como uma epidemia pela Organização Mundial da Saúde (WHO, 2000). O número de obesos praticamente dobrou nas últimas três décadas (WHO, 2014), sendo que cerca de 30% da população mundial está acima do peso ideal (Ng et al., 2014).

Segundo dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) e do Ministério da Saúde, entre os anos 1975 e 2015, a prevalência de homens e mulheres adultos obesos no Brasil aumentou de 2,8% para 18,1% e de 8% para 19,7%, respectivamente. Entre as crianças brasileiras, a prevalência de sobrepeso e obesidade aumentou de 10,9% para 34,8% nos meninos, e de 11,9% para 32,2% nas meninas. Entre os adolescentes, houve um aumento de 3,7% para 21,7% nos meninos, e de 7,6% para 19,4% nas meninas, de 1974 a 2009. A obesidade e o sobrepeso entre crianças e adolescentes brasileiros chegaram a 25,5% entre 2014 e 2018. Entre 1990 e 2018 houve um aumento de 60% na prevalência de sobrepeso e obesidade. Essa porcentagem sobe para 150% quando é considerado apenas o aumento da prevalência da obesidade entre crianças e adolescentes brasileiros (Simões, 2018).

Já nos Estados Unidos o número de adultos obesos chega a, aproximadamente, 78,6 milhões de pessoas, o que corresponde a 34,9% da população adulta (Ogden et al., 2014). Neste mesmo país, as taxas de obesidade mórbida aumentaram cerca de 70% entre os anos de 2000 e 2010. Além disso, o número de obesos com idade entre cinco e 19 anos cresceu de 11 milhões em 1975 para 124 milhões em 2016, o que equivale a mais de 10 vezes. Outros 213 milhões apresentavam sobrepeso em 2016 (Abarca-Gómez et al., 2017).

Apesar de a etiologia da obesidade não estar completamente definida, acredita-se que fatores metabólicos, genéticos e sociais têm um papel fundamental em seu desenvolvimento e progressão (Albert e Stunkard, 1996). Os fatores genéticos vêm sendo amplamente estudados. Mutações nos genes

*MC4R* (melanocortin 4 receptor), *FTO* (fat mass and obesity-associated) e *NMB* (neuromedin beta) foram associadas a pacientes obesos (Kirac et al., 2016). Estes genes e outros relacionados à obesidade têm como efeito primário a regulação do apetite e saciedade (Razquin et al., 2011).

O gene *MC4R*, quando ativado no hipotálamo, reduz a ingestão de alimentos e aumenta o gasto energético (Razquin et al., 2011). Além disso, a interrupção da sinalização da melanocortina no hipotálamo pode levar à redução da atividade física e à obesidade em camundongos (Jozkow et al., 2011) e também à obesidade monogênica rara de início precoce (Vollbach et al., 2017)

É possível que o gene *NMB* possa desempenhar um papel na regulação do comportamento alimentar e, por isso, no peso corporal. Esta suspeita se deve ao fato de tais mutações neste gene possuírem muitas associações com a susceptibilidade à fome e mudança na massa gorda ao longo do tempo (Reinehr et al., 2009). Bouchard et al. (2004) associaram uma mutação (rs1051168) no éxon 2 do *NMB* à aumento de peso corporal, índice de massa corporal e circunferência abdominal.

A alta expressão do gene *FTO* no hipotálamo, hipófise e supra-renais indica importante papel no eixo hipotalâmico-hipofisário-adrenal, implicado no peso corporal e na regulação da saciedade (Tanofsky-Kraff et al., 2009). Variações intrônicas comuns no gene *FTO* foram encontradas como sendo associadas com características relacionadas à obesidade em humanos (Vimalleswaran et al., 2009).

## **2.2 Obesidade em cães**

As causas e mecanismos de desenvolvimento da obesidade têm sido alvo de diversos estudos, tanto em humanos quanto em animais, com grande foco nas causas genéticas. Atualmente, conhecendo-se a causa multifatorial desta disfunção em cães, assim como no homem, pode-se usar estes animais em diferentes modelos de estudo, a fim de se discernir mais profundamente a influência de cada um dos fatores associados à obesidade.

Aptekmann (2014) encontrou a raça Labrador Retriever entre as quatro com maior prevalência de obesidade ou sobrepeso e, sabendo-se que cães dessa raça estão entre as duas com maior predisposição para a obesidade no Brasil e também está entre as seis em Portugal, juntamente com cães das raças Poodle, CockerSpaniel, Golden Retriever, Buldogue Francês e sem raça definida (Payan-Carreira et al., 2015). Diante disso, é ainda mais importante o papel profilático já desde a seleção destes animais para a reprodução, a partir do momento que temos conhecimento de fatores genéticos responsáveis pela propensão à obesidade.

Em medicina veterinária, a obesidade é a disfunção nutricional mais frequentemente observada em cães (German, 2006). Segundo Diez e Nguyen (2006), as taxas de incidência de obesidade em cães variam de 24 a 44%, indicando uma prevalência de, pelo menos, 20% em países industrializados. Já no Brasil, Jericó e Scheffer (2002) encontraram taxa de, aproximadamente, 17% na cidade de São Paulo, como pode ser observado na Tabela 1, adaptada de Diez e Nguyen (2006). Em Portugal esta prevalência é de 40% (5-80%) (Payan-Carreira et al., 2015).

**Tabela 1: Taxas de incidência de obesidade em populações de cães.**

<b>AUTORES</b>	<b>PAÍS</b>	<b>CÃES OBESOS (%)</b>	<b>N AMOSTRAL</b>
Mason, 1970	Reino Unido	28%	1000
Edney, 1974	Reino Unido	34%	1134
Meyer et al., 1978	Alemanha	30%	266
Steininger, 1981	Áustria	44%	-
Edney e Smith, 1986	Reino Unido	24%	8268
Armstrong e Lund, 1996	Estados Unidos	25%	23000
Lund et al., 1999	Estados Unidos	28%	30517
Jericó e Scheffer, 2002	Brasil	17%	648
Robertson, 2003	Austrália	25%	860

Modificada de Diez & Nguyen, 2006.



Um cão é considerado obeso quando sua gordura corporal ultrapassa os 15% (Burkholder e Toll, 1997). A grande preocupação em relação aos animais obesos está nas enfermidades e alterações relacionadas que incluem diabetes mellitus, alterações cardiovasculares e musculoesqueléticas, prejuízo na imunocompetência e redução da expectativa de vida (Robertson, 2003).

As adipocinas, liberadas pelo tecido adiposo, são responsáveis pela regulação da função cardiovascular, metabolismo energético, função cardiovascular e função imunológica (Radin et al., 2009). Porém, com o aumento da secreção dessas citocinas, como ocorre nos indivíduos obesos, há o desenvolvimento de alterações cardiorrespiratórias, ortopédicas e distúrbios metabólicos, como dislipidemias e redução da tolerância à glicose (German, 2006).

A redução da média da expectativa de vida como consequência da obesidade pode ser demonstrada no estudo de Kealy, et al. (2002) com Labradores Retrievers, que observaram que o grupo com restrição de 25% na ingestão alimentar apresentou uma média de 13 anos de vida, enquanto o grupo que recebeu dieta à vontade apresentou uma média de 11,2 anos de vida. Além disso, também foi observado um retardo no aparecimento de sinais clínicos de doenças crônicas. Smith et al. (2006), de maneira semelhante, também através da redução da mesma porcentagem na ingestão alimentar, observaram uma menor prevalência e atraso no aparecimento de osteoartrite em comparação ao grupo que recebeu dieta à vontade. Já Thengchaisri et al. (2014) associaram a obesidade abdominal a doenças cardiovasculares em cães.

Sabe-se que, juntos, três fatores contribuem para o desenvolvimento da obesidade em cães: pré-disposição genética, estado reprodutivo e o controle humano da dieta e da quantidade de exercício físico (Bland et al., 2009). Em relação à influência do estado reprodutivo e da idade, a maior prevalência está entre cães de 5 a 10 anos de idade (Diez e Nguyen, 2006) e animais castrados, pois o efeito inibitório do estrogênio sobre a ingestão de alimentos é cessado nas cadelas castradas (Haupt et al., 1979). No caso, principalmente, dos machos castrados, há uma diminuição nas atividades físicas espontâneas (Diez e Nguyen, 2006).

A Tabela 2, adaptada de Diez e Nguyen (2006), apresenta um resumo dos principais fatores de risco para a obesidade em cães.

**Tabela 2: Resumo dos principais fatores de risco para a obesidade em cães.**

<b>FATORES DE RISCO</b>	<b>RAÇAS</b>
Raça (fatores genéticos)	Labrador Retriever, Cairn Terrier, Scottish Terrier, Basset Hound, Cavalier King Charles Spaniel, Cocker Spaniel, Dachshund Pelo Longo, Beagle e raças gigantes de pelo longo
Idade	Mais comum em fêmeas (60%), especialmente as castradas
Sexo e estado reprodutivo	Mais comum em machos, especialmente os castrados
Estilo de vida sedentário	Fator significativo
Doenças endócrinas	Diabetes, hipotireoidismo, hiperadrenocorticism
Tratamento contraceptivo	Relações observadas
Alimentação	Erro no cálculo das necessidades energéticas (alimentação à vontade, controle inadequado, suplementos)
Fatores sociológicos	Antropomorfismo excessivo
Número de animais	Risco maior se houver apenas um animal

Adaptado de Diez & Nguyen (2006).

A contribuição dos tutores para o ganho de peso de seus animais é bastante relevante, visto que há dificuldade na mensuração da necessidade energética destes e de percepção da obesidade, além de baixo estímulo à prática de exercícios físicos (Markwell e Butterwick, 1994). O fato de o animal ter livre acesso à ração ao longo do dia e, além disso, ainda receber comida caseira e petiscos de forma não controlada, faz com que haja um consumo de calorias muito elevado. Considerando o estudo de SINGH et al. de 2002, com 200 proprietários, foi identificado que os proprietários subestimam o sobrepeso de seus animais em 20% a 30%, o que só reforça a prática de fornecimento de dietas com alto teor de calorias.

Dentre os fatores genéticos, sabe-se que cães da raça Labrador Retriever podem apresentar uma deleção de 14 pares de bases no gene pró-opiomelanocortina (*POMC*) localizado em 17:19431807-19431821. Tal mutação

foi associada a um maior peso corporal e com o escore de condição corporal (Raffan et al., 2016).

Como Raffan et al. (2016) encontraram uma adição de 1,9 kg ao peso corporal e de 0,48 pontos na escala (1-9) ao escore de condição corporal (ECC) por alelo afetado, supõe-se que tal mutação possa ter um caráter de dominância incompleta. Na dominância incompleta há um fenótipo heterozigoto intermediário entre os dois fenótipos de homozigotos (wild type e mutado).

Esta deleção irá interromper a sequência de codificação dos peptídeos neuroativos  $\beta$ -MSH e  $\beta$ -endorfina, o que leva a maior peso corporal, adiposidade e apetite (Raffan et al., 2016), porém os mecanismos que causam estes fenótipos ainda não foram completamente elucidados.

O gene *POMC* é expresso por neurônios do núcleo arqueado do hipotálamo, os quais são ativados pelo hormônio leptina no Sistema Nervoso Central (Cowley et al., 2001). Este pró-hormônio, sob a ação das pró-hormônio convertases, dá origem a peptídeos bioativos, incluindo a corticotrofina (ACTH), as melanocortinas - MSH ( $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$ ) e a  $\beta$ -endorfina.

Apesar de os fenótipos de peso e comportamento causados pelos baixos níveis de  $\beta$ -endorfina e  $\beta$ -MSH ainda não terem sido completamente compreendidos, estudos sobre o papel do  $\beta$ -MSH na regulação da homeostase da energia e apetite, foram limitados pelo fato dos roedores não apresentarem o sítio de clivagem proximal di-básico, que é necessário para a clivagem proteolítica para a produção do  $\beta$ -MSH (Challis et al., 2002; Lee et al., 2006). Além disso, a  $\beta$ -endorfina também tem relação com a recompensa oro-sensorial, principalmente em estados de alta necessidade (Mendez et al., 2015).

Ratos selecionados com a ausência da  $\beta$ -endorfina são obesos e hiperfágicos, o que sugere que a perda de ambos neuropeptídeos poderia contribuir para o fenótipo observado nos cães que com esta mutação no gene *POMC* (Appleyard et al., 2003).

Em relação ao tratamento da obesidade, o intuito é criar uma situação de balanço energético negativo, por meio do aumento do gasto energético e/ou

redução da ingestão calórica, para que haja mobilização do tecido adiposo do animal e, assim, perda de peso (Markwell e Butterwick, 1994). A redução da ingestão calórica deve ser feita com uma adaptação da dieta. Já o aumento do gasto energético deve ser feito com exercícios físicos, o que também irá promover um aumento da taxa metabólica basal.

Por se tratar de uma raça muito popular no Brasil e pelo fato da raça Labrador Retriever ter uma alta predisposição à obesidade, torna-se fundamental o controle do peso destes animais, bem como a profilaxia por meio do impedimento do cruzamento de animais afetados pela mutação no gene *POMC*, evitando, assim, todos os prejuízos à saúde e longevidade destes animais.

### **2.3 A raça Labrador Retriever**

Apesar de não existir um consenso sobre a origem da raça, uma das teorias é de sua origem canadense, descendente do cão de Saint Jones, o qual vivia na ilha de Terra Nova no século XVIII. Outra teoria é de que a raça tenha se originado na Groenlândia, onde seria utilizada pelos pescadores para recuperar os peixes que saltavam das redes e para transportar a própria rede. Apesar de não haver certeza sobre a origem da raça, sabe-se que seu desenvolvimento, de fato, ocorreu em terras britânicas. Já no início do século XX, após cruzamentos, principalmente com a raça Pointer, o Labrador Retriever teria sido importado para a Inglaterra, onde se fixou (Royal Canin).

A raça é utilizada como cão de caça, conhecida por apresentar bom comportamento e temperamento, ser obediente, companheiro fiel e ágil. Não possui traços de agressividade ou timidez. Também se destaca sua inteligência, vivacidade e natureza amigável. Apesar da queda no número de animais registrados de 2010 a 2017 no Brasil (Tabela 3), o Labrador Retriever continua sendo uma das raças mais populares no país (CBKC).

Fisicamente pode ser inteiramente preto, amarelo ou chocolate. A altura ideal na cernelha, segundo a Confederação Brasileira de Cinofilia (CBKC) é, nos machos de 56 a 57 cm e nas fêmeas de 54 a 56 cm. Possui a cauda muito grossa

na base, afinando até a ponta; sem franjas, coberta por pelos curtos, espessos e densos, descrita como “cauda de lontra” devido à aparência arredondada. O pelo é característico, sendo curto, denso e sem franjas.

**TABELA 3: Número de Labradores Retrievers registrados no Brasil de 2010 a 2017.**

<b>ANO</b>	<b>QUANTIDADE</b>
2010	3367
2011	2958
2012	2630
2013	2532
2014	1905
2015	1725
2016	1366
2017	1339

Fonte: Confederação Brasileira de Cinofilia (CBKC)

### **3. Objetivos**

Estimar a frequência alélica da deleção p.E188fs no gene *POMC*, responsável pela obesidade em cães da raça Labrador Retriever no Brasil.

#### 4. Referências bibliográficas

- ABARCA-GÓMEZ, L.; AABDEEN, Z.A.; HAMID, Z.A.; ABU-RMEILEH, N.M.; ACOSTA-CAZARES, B. et al. Worldwide trends in body-mass index, underweight, overweight, and obesity from 1975 to 2016: a pooled analysis of 2416 population-based measurement studies in 128.9 million children, adolescents, and adults. **The Lancet**, v.390, n.10113, p. 2627-2642, 2017.
- ALBERT, J., STUNKARD, M.D. Current Views on Obesity. **The American Journal of Medicine**, v.100, n.2, p.230-236, 1996.
- APPLEYARD, S.M.; HAYWARD, M.; YOUNG, J.I.; BUTLER, A.A.; CONE, R.D.; RUBINSTEIN, M.; LOW, M.J. A role for the endogenous opioid beta-endorphin in energy homeostasis. **Endocrinology**, v.144, n.5, p.1753-1760, 2003.
- APTEKMANN, K.P. Aspectos nutricionais e ambientais da obesidade canina. **Ciência Rural**, v.44, n.11, p.2039-2044, 2014.
- BLAND, I.M.; GUTHRIE-JONES, A.; TAYLOR, R.D.; HILL, J. Dog obesity: Owner attitudes and behaviour. **Preventive Veterinary Medicine**, v.92, n.4, p.333-340, 2009.
- BOUCHARD, L.; DRAPEAU, V.; PROVENCHER, V.; LEMIEUX, S.; CHAGNON, Y.; RICE, T.; RAO, D. C.; VOHL, A. M.; TREMBLAY, A.; BOUCHARD, C.; PÉRUSSE, L. Neuromedin b: a strong candidate gene linking eating behaviors and susceptibility to obesity. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v.80, n.6, p.1478-1486, 2004.
- BURKHOLDER, W.J.; TOLL, P.W. Controle da Obesidade. In: HAND, M.S. *et al.* **Small Animal Clinical Nutrition IV**. Topeka, Kansas: Mark Morris Institute, p.1-44, 1997.
- CHALLIS, B.G.; PRITCHARD, L.E.; CREEMERS, J.W.; DELPLANQUE, J.; KEOGH, J.M.; LUAN, J.; WAREHAM, N.J.; YEO, G.S.;

- BHATTACHARYYA, S.; FROGUEL, P., WHITE, A.; FAROOGI, I.S.; O'RAHILLY, S. A missense mutation disrupting a dibasic prohormone processing site in pro-opiomelanocortin (*POMC*) increases susceptibility to early-onset obesity through a novel molecular mechanism. **Human Molecular Genetics**, v.11, n.17, p.1997-2004, 2002.
- COLLIARD, L., ANCEL, J.; BENET, J.J.; PARAGON, B.M.; BLANCHARD, G. Risk factors for obesity in dogs in France. **Journal of Nutrition**, v.136, n.7, p.1951S-1954S, 2006.
- Confederação Brasileira de Cinofilia (CBKC). Disponível em: <[http://cbkc.org/application/views/docs/padroes/padrao-raca\\_173.pdf](http://cbkc.org/application/views/docs/padroes/padrao-raca_173.pdf)> Acesso em 20 de agosto de 2018.
- COURCIER, E.A.; THOMSON, R.M.; MELLOR, D.J.; YAM, P.S. An epidemiological study of environmental factors associated with canine obesity. **Journal of Small Animal Practice**, v.51, n.7, p.362-367, 2010.
- COWLEY, M.A.; SMART, J.L.; RUBINSTEIN, M.; CÉRDAN, M.G.; DIANO, S.; HORVATH, T.L.; CONE, R.D.; LOW, M.J. Leptin activates anorexigenic POMC neurons through a neural network in the arcuate nucleus. **Nature**, v.411, p.480-484, 2001.
- DIEZ, M.; NGUYEN, P. The epidemiology of canine and feline obesity. **Waltham Focus**, v.16, n.1, p.2-8, 2006.
- FRAYLING, T.M., TIMPSON, N.J., WEEDON, M.N., ZEGGINI, E., FREATHY, R.M., et al. A common variant in the FTO gene is associated with body mass index and predisposes to childhood and adult obesity. **Science**, v.316, p.889–894, 2007.
- GERMAN, A. The growing problem of obesity in dogs and cats. **The Journal of Nutrition**, v.136, n.7, p.1940S–1946S, 2006.
- HOUPT, K.A.; COREN, B.; HINTZ, H.F.; HILDERBRANT, J.E. Effect of sex and reproductive status on sucrose preference, food intake, and body weight



of dogs. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.174, n.10, p.1083-1085, 1979.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). Diretoria de Pesquisas. Coordenação de Trabalho e Rendimento. Pesquisa de Orçamentos Familiares 2009-2009: Antropometria e estado nutricional de crianças, adolescentes e adultos no Brasil. Rio de Janeiro, 2010. Disponível em: <https://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/livros/liv45419.pdf>

JERICÓ, M.M.; SCHEFFER, K.C. Aspectos epidemiológicos dos cães obesos na cidade de São Paulo. **Revista Clínica Veterinária**, v.37, p.25-29, 2002.

JOZKOW, P.; SLOWINSKA-LISOWSKA, M.; LACZMANSKI, L.; JAKUBIEC, D.; MEDRAS, M. Melanocortin-4 receptor gene polymorphism and the level of physical activity in men (HALS Study). **Endocrine**, v.39, n.1, p.62-68, 2011.

KEALY, R.D.; LAWLER, D.F.; BALLAM, J.M. Effect of diet restriction on life span and age--related changes in dogs. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.220, n.9, p.1315-20, 2002.

KIRAC, D; CAKIR, O.K.; AVCILAR, T.; DEYNELI, O.; KURTEL, H.; YAZICI, D.; KASPAR, E.C.; CELIK, N.; GUNEY, A.I. Effects of MC4R, FTO, and NMB Gene Variants to Obesity, Physical Activity, and Eating Behavior Phenotypes. **International Union of Biochemistry and Molecular Biology**, v.68, n.10, p.806-816, 2016.

LEE, Y.S.; CHALLIS, B.G.; THOMPSON, D.A.; YEO, G.S.; KEOGH, J.M.; MADONNA, M.E.; WRAIGHT, V.; SIMS, M.; VATIN, V.; MEYRE, D.; SHIELD, J.; BURREN, C.; IBRAHIM, Z.; CHEETHAM, T.; SWIFT, P., BLACKWOOD, A.; HUNG, C.C.; WAREHAM, N.J., FROGUEL, P.; MILLHAUSER, G.L.; O'RAHILLY, S.; FAROOGI, I.S. A POMC variant implicates beta-melanocyte-stimulating hormone in the control of human energy balance. **Cell Metabolism**, v.3, n.2, p.135-140, 2006.

- MARKWELL, P.J.; BUTTERWICK, R.F. Obesity. In: WILLS, J.M., SIMPSON, K.W. **The Waltham Book of Clinical Nutrition of the Dog & Cat**. Pergamon, p.131-148, 1994.
- MENDEZ, I.A.; OSTLUND, S.B.; MAIDMENT, N.T.; MURPHY, N.P. Involvement of endogenous enkephalins and b-endorphin in feeding and diet-induced obesity. **Neuropsychopharmacology**, v.40, n.9, p.2103-2112, 2015.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE. Agência Nacional de Saúde Suplementar. Saúde suplementar: vigilância de fatores de risco e proteção para doenças crônicas por inquérito telefônico. Estimativas sobre frequência e distribuição sociodemográfica de fatores de risco e proteção para doenças nas capitais de 26 estados brasileiros e no Distrito Federal em 2015. Brasília, 2017. Disponível em: [http://www.ans.gov.br/images/stories/Materiais\\_para\\_pesquisa/Materiais\\_por\\_assunto/2015\\_vigitel.pdf](http://www.ans.gov.br/images/stories/Materiais_para_pesquisa/Materiais_por_assunto/2015_vigitel.pdf)
- NG, M.; FLEMING T.; ROBINSON M. et al. Global, regional, and national prevalence of overweight and obesity in children and adults during 1980-2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. **The Lancet**, v.384, p.766-781, 2014.
- OGDEN, C.L.; CARROLL, M.D.; Kit, B.K.; FLEGAL, K.M. Prevalence of childhood and adult obesity in the United States, 2011-2012. **Journal of the American Medical Association**, v.311, n.8, p.806-814, 2014.
- PAYAN-CARREIRA, R.; SARGO, T.; NASCIMENTO, M.M. Canine obesity in Portugal: perceptions on occurrence and treatment determinants. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v.57, p.8, 2015.
- QI, L.; KRAFT, P.; HUNTER, D.J.; HU, F.B. The common obesity variant near MC4R gene is associated with higher intakes of total energy and dietary fat, weight change and diabetes risk in women. **Human Molecular Genetics.**, v.15:17, n.22, p.3502-3508, 2008.
- RADIN, M.J; SHARKEY, L.C.; HOLYCROSS, B.J. Adipokines: a review of

biological and analytical principles and an update in dogs, cats, and horses. **Veterinary Clinical Pathology**, v.38, n.2, p.136-56, 2009.

RAFFAN, E.; DENNIS, R.J.; O'DONOVAN, C.J.; BECKER, J.M.; SCOTT, R.A.; SMITH, S.P.; WITHERS, D.J.; WOOD, C.J.; CONCI, E.; CLEMENTS, D.N.; SUMMERS, K.M.; GERMAN, A.J.; MELLERSH, C.S.; ARENDT, M.L.; IYEMERE, V.P.; WITHERS, E.; SÖDER, J.; WERNERSSON, S.; ANDERSSON, G.; LINDBLAD-TOH, K.; YEO, G.S.H.; O'RAHILLY, S.A. Deletion in the Canine POMC Gene Is Associated with Weight and Appetite in Obesity-Prone Labrador Retriever Dogs. **Cell Metabolism**, v.23, n.5, p.893-900, 2016.

RAFFAN, E., SMITH, S.P., O'RAHILLY, S., WARDLE, J. Development, factor structure and application of the Dog Obesity Risk and Appetite (DORA) questionnaire. **PeerJ** 3:e1278; DOI 10.7717/peerj.1278, 2015.

RAZQUIN, C., MARTI, A., MARTINEZ, J.A. Evidences on three relevant obesogenes: MC4R, FTO and PPARc. Approaches for personalized nutrition. **Molecular Nutrition & Food Research**, v.55, n.1, p.136-149, 2011.

REINEHR, T.; KLEBER, M.; TOSCHKE, A.M. Lifestyle intervention in obese children is associated with a decrease of the metabolic syndrome prevalence. **Atherosclerosis**, v.207, n.1, p.174-180, 2009.

ROBERTSON, I.D. The association of exercise, diet and other factors with owner-perceived obesity in privately owned dogs from metropolitan Perth, WA. **Preventive Veterinary Medicine**, v.58, n.1-2, p.75-83, 2003.

ROYAL CANIN. Retriever de Labrador, 2019. Disponível em: <<https://www.royalcanin.pt/cao/retriever-de-labrador>>. Acesso em 22 de fevereiro de 2019.

SIMÕES, C.F.; LOPES, W.A.; REMOR, J.M.; LOCATELI, J.C.; LIMA, F.B.; SANTOS, T.L.C.; NARDO JUNIOR, N. Prevalence of weight excess in Brazilian children and adolescents: a systematic review. **Brazilian**

**Journal of Kinanthropometry and Human Performance**, v.20, n.4, p.517-532, 2018.

SINGH, R, LAFLAMME, D.P., SIDEBOTTOM-NIELSEN, M. Owner perceptions of canine body condition score. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v.16, n.3, p.362, 2002.

SMITH, G.K.; PASTER, E. R.; POWERS, M.Y.; LAWLER, D.F.; BIERY, D.N.; SHOFER, F.S.; MCKELVIE, P.J.; KEALY, R.D. Lifelong diet restriction and radiographic evidence of osteoarthritis of the hip joint in dogs. **Journal American Veterinary Medical Association**, v.229, n.5, p.690-693, 2006.

TANOFSKY-KRAFF, M., HAN, J.C., ANANDALINGAM, K., SHOMAKER, L.B., COLUMBO, K.M., et al. The FTO gene rs9939609 obesity-risk allele and loss of control over eating. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v.90, n.6, p.1483-1488, 2009.

THENGCHAI SRI, N.; THEERAPUN, W.; KAEWMOKUL, S.; SASTRAVAHA, S. Abdominal obesity is associated with heart disease in dogs. **BMC Veterinary Research**, v.10, p.131, 2014.

VIMALESWARAN, K.S.; LI, S.; ZHA, J.H.; LUAN, J.; BINGHAM, S.A. et al. Physical activity attenuates the body mass index-increasing influence of genetic variation in the FTO gene. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 90, n.2, p. 425–428, 2009.

VOLLBACH, H.; BRANDT, S.; LAHR, G.; DENZER, C.; VON SCHNURBEIN, J.; DEBATIN, K.M.; WABITSCH, M. Prevalence and phenotypic characterization of MC4R variants in a large pediatric cohort, **International Journal of Obesity**, v.41, p.13-22, 2017.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Obesity: preventing and managing the global epidemic. **World Health Technical Report Series 894**, i–xii, p. 1–253, 2000.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Global Status Report on Noncommunicable Diseases**, Suíça, 2014.

## *Capítulo II*

O trabalho redigido em conformidade com as normas da revista “Pesquisa Veterinária Brasileira”

### Canine *POMC* deletion (P187fs) allele frequency in Labrador Retrievers in Brazil.

Natália O. Lourenço<sup>2</sup>, Ana Luísa H. Albuquerque<sup>2</sup>, Roberta M. Basso<sup>2</sup>, Anelize S. Trecenti<sup>2</sup>, Lukas G. Albertino<sup>2</sup>, Alessandra Melchert<sup>2</sup>, Alexandre S. Borges<sup>2</sup> and José P. Oliveira-Filho<sup>2\*</sup>

**ABSTRACT.-** Lourenço N.O., Albuquerque A.L.H., Basso R.M., Trecenti A.S., Albertino L.G., Melchert A., Borges A.S. & Oliveira-Filho J.P. 2018. [**Canine *POMC* deletion (P187fs) allele frequency in Labrador Retrievers in Brazil.**] *Pesquisa Veterinária Brasileira* 00(0):00-00. 1Department of Veterinary Clinical Science, São Paulo State University (UNESP), School of Veterinary Medicine and Animal Science, Botucatu, Rua: Prof. Doutor Walter Mauricio Correa s/n, Cx Postal: 560, Botucatu, SP 18618-681, Brazil. E-mail: jose.oliveira-filho@unesp.br

The Labrador retriever is among the main breeds with the greatest predisposition to obesity. Several factors; especially the interrelationships between food management, exercise and social factors; influence the likelihood of a dog becoming obese. Furthermore, genetic factors are also responsible for obesity in dogs, and in Labrador retriever, a frameshift mutation (P187fs) in *pro-opiomelanocortin* (*POMC*) gene is strongly associated with obesity. There is no knowledge of studies that have previously evaluated the prevalence of the canine *POMC* deletion (P187fs) in Brazilian Labrador retriever. Therefore, the objective of this study was to investigate this mutation in Labrador retriever dogs in Brazil. Of the 108 Labrador retrievers that were assessed in this study, 59 were from a previous study, composed by animals assisted in a veterinary hospital with unknown lineage, and 49 were from a prospective study, composed of 19 pet and 30 assistance/rescue Labrador retriever dogs. The obesity risk and appetite questionnaire were applied, with some modifications, to tutors of the animals used in the prospective study. Fragments of the DNA, containing the mutation, were amplified by PCR and submitted to direct gene sequencing. The allele frequency of the mutation was 21.3% and was out of Hardy-Weinberg equilibrium ( $P < 0.05$ ). Using only the data of animals with known lineage, the presence of the mutated allele was higher in the assistance/rescue dogs than pets ( $P < 0.01$ ), furthermore, the allele frequencies observed in assistance group (31.7%) was out of Hardy-Weinberg equilibrium ( $P < 0.05$ ), while that in the pet group (18.4%) was in equilibrium ( $P > 0.05$ ). Although the mutation has increased the food-motivation in the assistance/rescue dogs, other variables, especially frequent exercising, favored that these animals maintained the ideal body weight (body condition score = 5). In summary, the Hardy-Weinberg disequilibrium observed in the allele distribution of the deletion *POMC*\_P187fs in this study, independently of the Labrador retriever group assessed, suggesting the possibility of positive selection of the mutated allele, which may lead to the maintenance of this deleterious allele in this population.

INDEX TERMS: mutation, dog, obesity, prevalence, Brazil.

**RESUMO.-** O Labrador retriever é uma das principais raças caninas com maior predisposição à obesidade. Vários fatores, especialmente as inter-relações entre a alimentação, exercício e fatores sociais, influenciam a probabilidade de um cão se tornar obeso. Além disso, fatores genéticos são também responsáveis pela obesidade em cães, e no Labrador retriever a mutação “frameshift” P187fs no gene pró-opiomelanocortina (*POMC*) está fortemente associada à obesidade. Não existem estudos prévios de prevalência da deleção P187fs no gene *POMC* em Labradores retrievers no Brasil. Portanto, o objetivo deste estudo foi investigar esta mutação em cães da raça Labrador retriever no Brasil. Dos 108 Labradores retrievers avaliados neste estudo, 59 eram de um estudo retrospectivo (composto por animais atendido no hospital veterinário e sem linhagem conhecida) e 49 eram de um estudo prospectivo (composto por 19 cães pet e 30 cães de assistência/resgate). Um questionário de risco de obesidade modificado foi aplicado nos tutores dos animais usados no estudo prospectivo. Fragmentos de DNA, contendo a mutação, foram amplificados por PCR e submetidos ao sequenciamento gênico direto. A frequência alélica da mutação foi de 21,3% e estava fora do equilíbrio de Hardy-Weinberg ( $P < 0,05$ ). Usando somente os dados dos animais de linhagem conhecida, a presença do alelo mutado foi maior no grupo de cães de assistência/resgate que no grupo de pets ( $P < 0,01$ ), além disso, as frequências alélicas nos grupos de assistência/resgate (31,7%) e no de pets (18,4%) estavam fora e em equilíbrio de Hardy-Weinberg ( $P < 0,05$ ), respectivamente. Embora a mutação tenha aumentado a motivação pelo alimento em Labradores retriever do grupo de assistência/resgate, outras variáveis, especialmente o frequente exercício, favoreceu a manutenção o peso corporal ideal (peso corporal = 5). Em resumo, o desequilíbrio de Hardy-Weinberg observado na distribuição do alelo *POMC*\_P187fs observado neste estudo,

independentemente do grupo de Labrador Retriever avaliado, sugere a possibilidade de uma seleção positiva para o alelo mutado, o qual poderá levar a manutenção desse alelo deletério nesta população.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: mutação, cão, obesidade, prevalência, Brasil.

## INTRODUCTION

Obesity or excessive overweight is characterized by the accumulation of excessive amounts of adipose tissue in the body and is the most common nutritional disorder in companion animals (German 2006). As in humans, several disorders may be due to obesity in dogs, especially, metabolic and endocrine abnormalities, orthopedic disease, cardiorespiratory disease (Pöppel & González 2005, German 2006, Lund et al. 2006, Clarck & Hoening 2016, Frye et al. 2016). Obesity in dogs is affected by the interrelationships between food management, exercise and social factors (Bland et al. 2009, Aptekmann et al. 2014, Debastiani et al. 2018). The higher prevalence of canine obesity seen in recent years may be also influenced by the increase in human obesity (Raffan et al. 2016).

Furthermore, genetic factors are also responsible for obesity in dogs (Skorczyk et al. 2007, Grzes et al. 2011, Skorczyk et al. 2011, Mankowska et al. 2015, Miyabe et al. 2015) and specifically in Labrador retriever a frameshift mutation (P187fs) in *pro-opiomelanocortin (POMC)* gene is strongly associated with obesity (Raffan et al. 2016). This mutation provokes a 14 bp deletion in the *POMC* gene, who causes loss of production of  $\beta$ -MSH (melanocyte-stimulating hormone) and  $\beta$ -endorphin (Raffan et al. 2016). Although, the mechanism by which reduced  $\beta$ -MSH and  $\beta$ -endorphin due to the mutation causes behavioral and weight phenotypes remains to be precisely elucidated, Raffan et al. (2016) observed that *POMC*\_P187fs mutation is associated with increased body weight (per allele effect of 0.33 SD), adiposity, and greater food motivation. The *POMC*\_P187fs mutation was found closely related to flat-coat Retriever, however, it was absent from dogs of 38 other diverse breeds (Raffan et al. 2016).

Obesity is the second major primary disorder observed in Labrador retrievers in the United Kingdom (McGreevy et al. 2018). As in other countries (Payan-Carreira et al. 2015, McGreevy et al. 2018), the Labrador retriever is among the main breeds with the greatest predisposition to obesity in Brazil (Braos et al. 2009, Aptekmann et al. 2014, Debastiani et al. 2018). In addition, there is no knowledge of studies that have previously evaluated the prevalence of the canine *POMC* deletion (P187fs) in Brazilian Labrador retriever. Therefore, the objective of this study was to investigate this mutation in Labrador retriever dogs in Brazil.

## MATERIALS AND METHODS

**Ethics statement.** All procedures were approved by the Board of Ethics and Animal Experimentation of the institution (Protocol nº 220/2016 – CEUA).

**Experimental animals and samples.** For the present molecular study, blood or buccal swab was randomly collected from 108 Labrador retrievers mainly from states of São Paulo (89/108), followed by Santa Catarina (13/108), Minas Gerais (3/108), and Pernambuco (3/108), based on informed consent. Labrador retriever cohort was composed of 69 females (64%) and 39 males (36%), with ages ranging from ten months to 15 years (average age of 6.6 years old). According to age, the animals were divided into three groups: young animals (age under 5 years), adult animals (age ranging from 5 to 10 years), and old animals (age over 10 years).

The body condition score (BCS) of all dogs was attributed by veterinary practitioners using previously validated standard chart of the WSAVA (World Small Animals Veterinary Association) (Laflamme, 1997, Kealy et al. 2002, Mawby et al., 2004 German et al. 2010, Jeusette et al. 2010), who had representative images and accompanying descriptors. The dogs were classified on a scale of 1–9 (1 to 3-BCS under ideal; 4 to 5-BCS ideal; and 7 to 9-BCS over ideal), and the animals with BCS 7, 8 and 9 were considered obese.

Of the 108 dogs assessed in this study, 59 were Labrador retrievers that had been submitted to the Veterinary Hospital at FMVZ Unesp Botucatu for medical examination, and blood samples from these dogs were used for genomic DNA extraction. The prospective study used the remaining 49 Labrador retrievers, where a buccal swab was collected from these animals and the Obesity Risk and Appetite (DORA) questionnaire was applied, with some modifications, to tutors of these animals (Raffan et al. 2015).

**DNA purification and genotyping analysis.** Genomic DNA was purified from blood or buccal swab samples using the GenElute™ Genomic Blood DNA Kit (Sigma-Aldrich®) according to the manufacturer's instructions. The DNA obtained was used to genotype the deletion (P187fs) in



the *POMC* gene previously associated with obesity in Labrador retrievers (Raffan et al. 2016). Two specific primers (JPPOMC-F3 5'-AAGCCGGTGGGCAAGAA-3', and JPPOMC-R3 5'-GGAAGTGCTCCATCTTGTAGGG-3') were designed with Primer Express software (Applied Biosystems, Grand Island, NY) to genotype the *POMC*\_P187fs (244-bp). The specificity of the PCR primers was evaluated in silico with the Basic Local Alignment Search Tool (National Center for Biotechnology Information/USA). Polymerase chain reactions were performed in a total volume of 25  $\mu$ L, which contained 2.5  $\mu$ L of template DNA, 0.3  $\mu$ M each forward and reverse primer, 1.25  $\mu$ L of DMSO (5% v/v), 12.5  $\mu$ L of GoTaq<sup>®</sup> Green PCR Master Mix (Promega), and 7.5  $\mu$ L of nuclease-free water q.s.p. In addition, a no-template control reaction was performed to check for the possible presence of contamination in the PCR preparations. The amplification conditions were as follows: initial denaturation at 95°C for 5 minutes, followed by 40 cycles of denaturation at 95°C for 30 seconds, annealing at 63.5°C for 1 minute, and extension at 72°C for 1 minute, and final extension at 72°C for 5 minutes. Amplicons were analysed by 1.5% agarose gel electrophoresis, purified, and subjected to direct sequencing. The obtained PCR products were analyzed via 1.5% agarose gel electrophoresis (Invitrogen<sup>™</sup>, Carlsbad, CA), stained with the Sybr<sup>®</sup> Safe DNA Gel Stain (Invitrogen<sup>™</sup>), purified using the QIAquick<sup>®</sup> PCR Purification Kit (Qiagen<sup>®</sup>), and then subjected to direct sequencing.

**Sequencing analysis.** To sequence the DNA, 10  $\mu$ L of each PCR product, 5  $\mu$ L of the purified forward primer and BigDye<sup>®</sup> Terminator Cycle Sequencing Kit were used (Life Technologies<sup>™</sup> CA, USA). The sequences were determined using the ABI 3500 Genetic Analyzer (Life Technologies<sup>™</sup> CA, USA). The obtained sequences and the electropherograms (Fig. 1) were analyzed using Geneious<sup>®</sup> 10.0.9 (Biomatters Ltd, Auckland, New Zealand). The sequences were compared with the *Canis lupus familiaris* *POMC* sequence (XM\_022404519.1), deposited in GenBank<sup>™</sup>, using BLAST (Basic Local Alignment Search Tool, <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

**Data analysis.** Chi-square or Fisher tests were used to compare the proportion of obesity and genotype versus age, gender, and coat colour. The prospective groups of assistance/rescue and pets Labrador retrievers were compared using Chi-square or Fisher tests, in order to analyse proportion of obesity and genotype versus exercise frequency, type of food (house feeding or commercial dog food), and behaviour features (excitement, unremitting interest, snack training, speed of intake, and selective behaviour). Statistical analyses were conducted using GraphPad Prism<sup>®</sup> version 7 for Windows and the level of statistical significance was set at 0.05. The genotypic frequency was estimated and the data were analyzed descriptively. The chi-square test was also used to test whether alleles were in Hardy-Weinberg equilibrium within different groups.

## RESULTS AND DISCUSSION

The samples used in the previous study (n=59) belonged to the DNA bank of the Biomol Laboratory of the Department of Veterinary Clinical Science of the FMVZ/UNESP and were collected during 2015 and 2016, while the samples used in the prospective study (n=49) were collected during 2017 and 2018. Of the 108 Labrador retrievers tested, 16 dogs (15%) were identified as homozygous for deletion *POMC*\_P187fs, 14 dogs (13%) were identified as heterozygous, and 78 (72%) were homozygous for the wild-type (WT) allele (Table 1). Therewith, in the present study the allele frequency of the mutant allele (21.3%) was higher than that observed in UK and USA (12%; 2% homozygous for deletion, 20% heterozygous, and 78% WT) (Raffan et al. 2016). Differently from what was observed in these two countries (Raffan et al. 2016), the allelic distribution of the deletion *POMC*\_P187fs was out of Hardy-Weinberg equilibrium in the population evaluated in the present study ( $P < 0.01$ ). Furthermore, when analysing separately the groups of animals of the previous study (composed of 59 Labrador retrievers of unknown lineage.) and prospective (composed of 19 pet and 30 assistance/rescue Labrador retriever dogs) were observed frequencies of 19.5% and 23.5%, respectively, and both frequencies were out of Hardy-Weinberg equilibrium ( $P < 0.01$ ). However, using only the data of animals with known lineage, the presence of the mutated allele was statistically higher ( $P = 0.0423$ ) in the assistance/rescue dogs than pets dogs, furthermore, the allele frequencies observed in this group (31.7%) was out of Hardy-Weinberg equilibrium ( $P < 0.01$ ), while the allele frequencies (18.4%) observed in the pet group was in equilibrium ( $P = 0.122$ ). Therefore, these results were similar to those of Raffan et al. (2016), which observed that the mutation was significantly more common in Labrador retrievers selected to become assistance dogs than pets (allele frequencies, 45% vs. 12%), and the allelic distribution of the deletion *POMC*\_P187fs in the assistance dogs was out of Hardy-Weinberg equilibrium, while in the pet group was in equilibrium. These authors believed that temperament and trainability are the main drivers for selection of

assistance dogs, and positive reinforcement with food reward is a mainstay of puppy training, and with this, dogs carrying the *POMC* deletion may be more likely to be selected as assistance dogs.

Of the 69 females evaluated, nine (13%) were identified as homozygous for deletion *POMC\_P187fs*, nine (13%) were identified as heterozygous for the deletion *POMC\_P187fs*, and 51 (74%) were homozygous for the wild-type (WT) allele. While of the 39 males evaluated, seven (18%) were identified as homozygous for deletion *POMC\_P187fs*, five (13%) were identified as heterozygous for the deletion *POMC\_P187fs*, and 27 (69%) were homozygous for the WT allele. According to age, 29 (27%) Labrador retrievers were young, 60 (55%) were adult, and 19 (18%) were old. The allele mutated distribution in these age group was as follows: young dogs were 4% homozygous for deletion, 17% heterozygous, and 79% WT; adult dogs were 23% homozygous for deletion, 12% heterozygous, and 65% WT; and old dogs were 5% homozygous for deletion, 11% heterozygous, and 84% WT. In the present study, there was no relationship between gender ( $P = 0.7861$ ) or age ( $P = 0.0886$ ) with the genotype of the animals. This was expected since the deletion *POMC\_P187fs* is an autosomal mutation, not related to sex chromosomes and age of the animals (Raffan et al. 2016).

In the present study, more obese females (49%, 34/69) were observed than obese male (36%, 14/39), however, there was no statistical difference ( $P = 0.2297$ ) in the proportion of obese and lean Labrador retrievers between males (14 obese and 25 leans) and females (34 obese and 35 leans). On the other hand, obesity was statistically more frequent in old animals than in young and adult animals ( $P = 0.0408$ ). Although, the correlation between age or gender with canine obesity is well established, being females and old dogs more susceptible to obesity (Braos et al. 2009, Aptekmann et al. 2014, Debastiani et al. 2018), there are other variables that may increase the risk of a dog being obese.

Forty-seven percent of dogs assessed in the present study were yellow (51/108), 29% black (31/108), and 24% chocolate/liver (26/108). Although chocolate Labrador retrievers had a significantly shorter lifespan than non-chocolate Labrador retrievers (McGreevy et al. 2018), in the present study, no relationship was observed between the coat colour and obesity ( $P = 0.8949$ ) or genotype ( $P = 0.0682$ ).

In order to verify the relation between of the deletion *POMC\_P187fs* and obesity versus other variables, the DORA questionnaire (Raffan et al. 2015) was applied, with some modifications, to tutors of the dogs of the prospective study. As previously stated in the present study, the presence of the mutated allele was statistically higher ( $P = 0.0423$ ) in the assistance/rescue dogs than pets Labrador retrievers, nevertheless, the dogs of the assistance/rescue lineage (seven obese and 23 non-obese) were statistically lean ( $BCS \leq 5$ ) than the pets (ten obese and nine non-obese) ( $P = 0.0062$ ). Raffan et al. (2016), observed the positive influence of the *POMC* deletion with higher body weight ( $p < 0.0001$ ; mean effect size 1.9 kg per deletion allele), and that assistance/rescue dogs were more affected by it. The controversial findings observed in the present study may be explained according to other aspects observed in the assistance/rescue dogs, i.e., these dogs were submitted to a greater frequency of exercise (three or more times a week) than the pets ( $P = 0.0021$ ), and the supply of human food only occurred in the pets group ( $P = 0.0002$ ). On the other hand, assistance/rescue dogs, influenced by the genotype (Raffan et al., 2016), were more excited ( $P = 0.0183$ ) and had an incessant interest in the food ( $P = 0.0035$ ); and received more snacks ( $P = 0.0378$ ) than pets. It is known that obesity in dogs is influenced by the interrelationship between food management, exercise and social factors (Bland et al. 2009, Aptekmann et al. 2014, Debastiani et al. 2018). However, the higher frequency of exercise and the single supply of animal feed overrides the food-motivation observed in the assistance/rescue group, making them less obese.

## CONCLUSION

In summary, the present study shows the existence of the deletion *POMC\_P187fs* in Labrador retriever in Brazil. The Hardy-Weinberg disequilibrium observed in the allelic distribution of the deletion *POMC\_P187fs* in this study, independently of the Labrador Retriever group assessed, suggesting the possibility of positive selection of the mutated allele, which may lead to the maintenance of this deleterious allele in this population. The presence of the mutated allele was significantly more common in Labrador retrievers selected to become assistance/rescue dogs. However, although the mutation has increased the food-motivation in these group of the Labrador retrievers, other variables, especially the frequent exercise, favored that these animals maintained the ideal body weight ( $BCS = 5$ ).

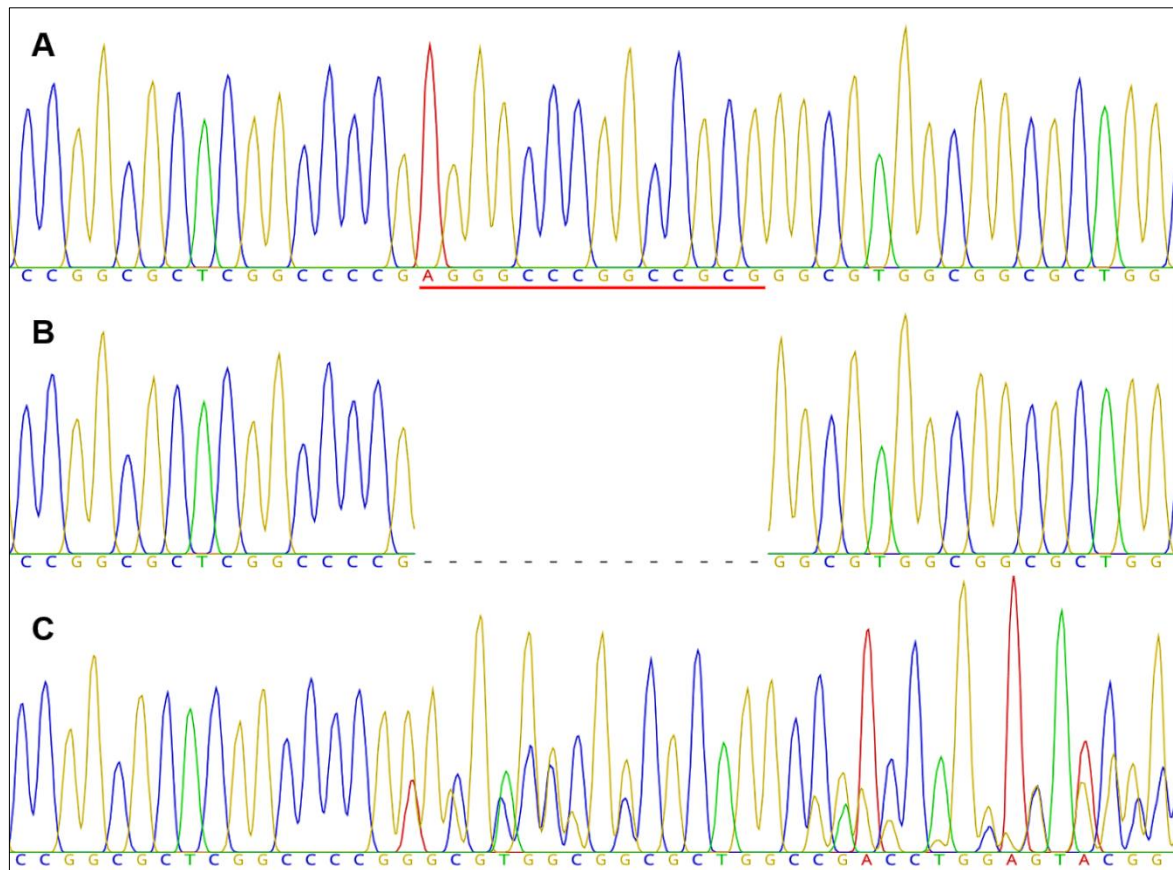
**Acknowledgments.** - This study was carried out at the São Paulo State University (UNESP) and in part as the fulfilment of the master science thesis of NOL at São Paulo State University (UNESP), Brazil.

**Conflict of interest statement.** - None of the authors of this paper has a financial or personal relationship with other people or organizations that could inappropriately influence or bias the content of the paper.

#### REFERENCES

- Aptekmann K.P., Suhett WG, Mendes Junior A.F., Souza G.B., Tristão A.P.P.A., Adams F.K., Aoki C.G., Palacios Junior R.J.G., Carciofi A.C. & Tinucci-Costa M. 2014. Aspectos nutricionais e ambientais da obesidade canina. *Ciencia Rural*. 44:2039-2044.
- Bland I.M., Guthrie-Jones A., Taylor R.D. & Hill J. 2009. Dog obesity: owner attitudes and behaviour. *Prev. Vet. Med.* 92:333-340.
- Braos A.C., Zanluchi A.T., Kemper B., Navas Padilha F. & Trapp S.M. 2009. Aspectos físicos e epidemiológicos da obesidade canina. *Ciênc. Vet. Tróp.* 12:35-40.
- Clark M. & Hoenig M. 2016. Metabolic Effects of Obesity and Its Interaction with Endocrine Diseases. *Vet Clin North Am. Small Anim. Pract.* 46:797-815.
- Debastiani C. 2018. Epidemiologia da obesidade canina: Fatores de risco e complicações. Tese de Mestrado, Universidade Estadual Paulista "Julio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Botucatu. 82p.
- Frye C.W., Shmalberg J.W. & Wakshlag J.J. 2016. Obesity, Exercise and Orthopedic Disease. *Vet. Clin. Small. Anim.* 46:831-841
- German A.J. 2006. The Growing Problem of Obesity in Dogs and Cats. *J. Nutr.* 136:1940S-1946S.
- German A.J., Holden S.L., Morris P.J. & Biourge V. 2010. Comparison of a bioimpedance monitor with dual-energy x-ray absorptiometry for noninvasive estimation of percentage body fat in dogs. *Am. J. Vet. Res.* 71:393-398.
- Grzes M., Szczerebal I., Fijak-Nowak H., Szydłowski M. & Switonski M. 2011. Two candidate genes (FTO and INSIG2) for fat accumulation in four canids: chromosome mapping, gene polymorphisms and association studies of body and skin weight of red foxes. *Cytogenet. Genome Res.* 135:25-32.
- Jeusette I., Greco D., Aquino F., Detilleux J., Peterson M., Romano V. & Torre C. 2010. Effect of breed on body composition and comparison between various methods to estimate body composition in dogs. *Res. Vet. Sci.* 88:227-232.
- Kealy R.D., Lawler D.F., Ballam J.M., Mantz S.L., Biery D.N., Greeley E.H., Lust G., Segre M., Smith G.K. & Stowe HD. 2002. Effects of diet restriction on life span and age-related changes in dogs. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 220:1315-1320.
- Laflamme DP. 1997. Development and validation of a body condition score system for dogs. *Canine Pract.* 22:10-15.
- Lund E.M., Armstrong P.J., Kirk C.A. & Klausner J.S. 2006. Prevalence and risk factors for obesity in adult dogs from private US veterinary practices. *Int. J. Appl. Res. Vet. Med.* 4:177-186.
- Mankowska M., Stachowiak M., Graczyk A., Ciazynska P., Gogulski M., Nizanski W. & Switonski M. 2015. Sequence analysis of three canine adipokine genes revealed an association between TNF polymorphisms and obesity in Labrador dogs. *Anim. Genet.* 47:245-249.
- Mawby D.I., Bartges, J.W., d'Avignon A., Laflamme D.P., Moyers T.D. & Cottrell T. 2004. Comparison of various methods for estimating body fat in dogs. *J. Am. Anim. Hosp. Assoc.* 40:109-114.
- McGreevy P.D., Wilson B.J., Mansfield C.S., Brodbelt D.C., Church D.B., Dhand N., Soares Magalhães R.J. & O'Neill D.G. 2018. Labrador retrievers under primary veterinary care in the UK: demography, mortality and disorders. *Canine Genet. Epidemiol.* 5:8.
- Miyabe M., Gin A., Onozawa E., Daimon M., Yamada H., Oda H., Mori A., Momota Y., Azakami D., Yamamoto I., Mochizuki M., Sako T., Tamura K. & Ishioka K. 2015. Genetic variants of the unsaturated fatty acid receptor GPR120 relating to obesity in dogs. *J. Vet. Med. Sci.* 77:1201-1206.
- Payan-Carreira R., Sargo T. & Nascimento M.M. 2015. Canine obesity in Portugal: perceptions on occurrence and treatment determinants. *Acta Vet. Scand.* 57:P8.
- Pöppl A.G. & González F.H.D. 2005. Aspectos epidemiológicos e clínico-laboratoriais da Diabetes Mellitus em cães. *Acta Scient. Vet.* 33:33-40.
- Raffan E., Smith S.P., O'Rahilly S. & Wardle J. 2015. Development, factor structure and application of the dog obesity risk and appetite (DORA) questionnaire. *PeerJ* 3:e1278.
- Raffan E., Dennis R.J., O'Donovan C.J., Becker J.M., Scott R.A., Smith S.P., Withers D.J., Wood C.J., Conci E., Clements D.N., Summers K.M., German A.J., Mellersh C.S., Arendt M.L., Iyemere V.P., Withers E., Söder J., Wernersson S., Andersson G., Lindblad-Toh K., Yeo G.S. & O'Rahilly S. 2016. A Deletion in

- the Canine *POMC* Gene Is Associated with Weight and Appetite in Obesity-Prone Labrador Retriever Dogs. *Cell Metab.* 23:893-900.
- Skorczyk A., Stachowiak M., Szczerbal I., Klukowska-Roetzler J., Schelling C., Dolf G. & Switonski M. 2007. Polymorphism and chromosomal location of the MC4R (melanocortin-4 receptor) gene in the dog and red fox. *Gene* 392:247-252.
- Skorczyk A., Flisikowski K., Szydłowski M., Cieslak J., Fries R. & Switonski M. 2011. Association of MC3R gene polymorphisms with body weight in the red fox and comparative gene organization in four canids. *Anim. Genet.* 42:104-107.



**Fig.1** Partial chromatogram showing capillary sequencing results from wild-type (A), homozygous deletion (B), and heterozygous (C) Labrador retriever dogs. It is possible to observe in “A” the 14 bp (AGGGCCGCGCGCG) of the deletion *POMC\_P187fs* (underlined), while at “B” these 14 bases are absent. The double peaks may be observed in “C” from the beginning of the deletion *POMC\_P187fs*, ie, the 14 bp are only deleted in one allele. Image obtained in the Geneious® 10.0.9 software (Biomatters Ltd, Auckland, New Zealand).

**Table 1.** Genotype prevalence, allele frequency, and Hardy-Weinberg analysis of the deletion *POMC\_P187fs* in Labrador retrievers dogs.

Group	GENOTYPE			Allele frequency	Hardy-Weinberg equilibrium <sup>1</sup>
	Wild-type	Heterozygous for deletion	Homozygous for deletion		
Total group	72% (78/108)	13% (14/108)	15% (16/108)	21,3%	Out P = 0,0000007
Retrospective group	76% (45/59)	9% (5/59)	15% (9/59)	19,5%	Out P = 0,00000004
Prospective group	67% (33/49)	19% (9/49)	14% (7/49)	23,5%	Out P = 0,00002
Pets Labrador retrievers	69% (13/19)	26% (5/19)	5% (1/19)	18,4%	In P = 0,12230
Assistance/rescue Labrador retrievers	60% (18/30)	17% (5/30)	23% (7/30)	31,7%	Out P = 0,000000007

<sup>1</sup> Chi-square test, if P <0.05 - not consistent with Hardy-Weinberg equilibrium.

Normas de submissão: Instruções aos autores: Pesquisa Veterinária Brasileira,  
disponível em <http://www.pvb.com.br>

## GUIDE FOR AUTHORS

Papers to “Pesquisa Veterinária Brasileira” (PVB), a Brazilian Journal of Veterinary Research, are submitted in Word online through ScholarOne, link <<https://mc04.manuscriptcentral.com/pvb-scielo>>

The authors should submit their papers in English, with a Portuguese Summary. To prove the quality of the English, a certificate of the English language is required, with exception of authors native in English.

With the communication of acceptance of the paper, the author for correspondence will be asked for payment of a Paper Charge of US\$ 480.00 (R\$ 1.500,00) for each article submitted in English.

As of 2019, all authors should register in the ORCID (Open Researcher and Contributor ID - <https://orcid.org/register>) and link it to their ScholarONE profile. The link can be done by editing the user profile on ScholarONE in the option Associate your existing ORCID iD. The ORCID identifiers contribute to the singular identification of the authors and to the interoperational and bibliometric processes. Using an ORCID, researchers are easily and correctly connected with their research results, publications and affiliations.

Papers should be prepared in all details according to the style of the journal ([www.pvb.com.br](http://www.pvb.com.br)), in order to be peer reviewed. Tables and Figures should be submitted separately from the text.

PVB publishes Original Articles, but also Critical Literature Reviews and Topics of General Interest; no Short Communications are accepted.

Case Reports will be accepted only in articles classified as Wildlife Medicine.

The Original Papers should contain research results not yet published and not submitted to other journals.

Literature Reviews should be critical and consist of subjects of the author's research line.

Topics of General Interest should be of great importance and based on large experience of the authors.

The opinions and concepts emitted are of the responsibility of the authors. The Editorial Board of the journal, assisted by the peer review, may suggest or ask for modification of the text.

The author rights of the accepted papers are preserved.

1. The submitted article should be organized in TITLE, ABSTRACT, RESUMO (the last when authors are from a Portuguese speaking country), INTRODUCTION, MATERIALS AND METHODS, RESULTS, DISCUSSION,

CONCLUSION(S) (the last three preferably as separate chapters),  
Acknowledgements, Conflict of interest statement and REFERENCES:

a) The TITLE should be concise and indicate the content of the article;  
details of scientific identification should be put into MATERIALS AND METHODS.

b) Authors with several first and family names should shorten their names  
for scientific publication, as for example: Cláudio Severo Lombardo de Barros  
writes Cláudio

S.L. Barros or Barros C.S.L., and Franklin Riet-Correa Amaral writes Franklin  
Riet-Correa or Riet-Correa F. The papers should not have more than 8 (eight)  
authors. Corresponding author should be one who guarantees the contact with  
the Editorial Board of PVB. Asterisks for call to the footnotes should be elevated  
once more, in order to appear larger.

c) The heading of the ABSTRACT should contain the shortened and  
inverted names of the authors, the year, the Title (in brackets when translated), and  
the postal address of the laboratory or institution where the main part of the  
research was done (Always compare the authors of the paper and their shortened  
and inverted in the heading of the Abstract to avoid discrepancies).

d) The footnote of the first page should contain the complete professional  
address of each author (in the language of the author's country where to  
correspondence could be posted, Portuguese, Spanish, English, etc.) as well as  
the underlined e-mail of the corresponding author.



e) The ABSTRACT should be a well explained version of the Portuguese RESUMO, followed by “INDEX TERMS” which should include terms of the title, as they are not only Additional Index Terms.

f) The RESUMO should contain (1) what have been investigated, indicating (2) materials and methods used, (3) the most important results, and (4) the conclusion, followed by “TERMOS DE INDEXAÇÃO” (which include also words of the title, as they are not only Additional Index Terms).

g) The INTRODUCTION should be short, with citation of the specific literature without assuming main importance, followed by the objective of the research.

h) In MATERIALS AND METHODS should be given all data necessary for other research workers to repeat the research.

i) In RESULTS are presented the data obtained in a concise form.

j) In DISCUSSION the results should be confronted with the literature. Research in development or future planning should not be mentioned, to avoid the obligation for the journal to publish the results.

k) The CONCLUSIONS should be based only on the results obtained.

l) Acknowledgements should not be mentioned in the text or in footnotes.

m) Conflict of interest or none should be mentioned.

n) The REFERENCES include all citations consulted and presented chronologically in the text. The List of References should be written in

alphabetical and chronological order, beginning with the family name of the first author, followed by the names of all other authors of the respective reference, in capital and small letters, and each author divided only by a comma, followed by year, title and the data of the publication (extensively in case of doubt about abbreviation) according to [www.pvb.com.br](http://www.pvb.com.br).

2. During the elaboration of the paper, the style of the journal has to be attended, as follows:

a) Font Cambria at 10 pitch, simple space between lines; page format A4, with 2cm margins (superior, inferior, left and right), text in one column justified, with Figure captions below the list of References; without repeating the captions with the images of the Figures. Figures and Tables should be separately submitted.

b) ABSTRACT and RESUMO are written in only one paragraph and should not contain references.

c) The articles should be concise, always when possible in past tense and impersonal.

d) The scientific names should be presented in full (p.ex. *Palicourea marcgravii*) at the beginning of each chapter (Title, Abstract, Resumo, Introduction, etc.) when they appear for the first time, followed with abbreviation of the genus (p.ex. *P. marcgravii*).

e) In the Title of Tables and in Figure captions the scientific names are written in full.

f) In the text, calls to footnotes are given in Arabic numbers, in crescent order through the whole paper, without use of “Insert final note” of Word.

Note: To avoid separation in two lines, numbers should be presented without space to their units (p.ex.: 100ppm, 10mm, 50cm, 18x10cm,  $P<0.05$ ).

The abbreviation for number is “n<sup>o</sup>” and not “no”; for degree Celsius “oC” and not “oC”.

g) Tables and Figures should be cited in the text with their respective numbers in crescent order.

h) Abbreviations of institutions when presented in the first place should be put within parentheses, after the full name of the institution.

i) Citations of the literature in the text are given by “author and year” (p.ex. Caldas 2005); papers with two authors are cited with the two names (p.ex. Pedroso & Pimentel 2013); citations with more than two authors are cited in the text by the name of the first author followed by “et al.” and the year (p.ex. Brito et al. 2015). If two articles are not to distinguish, the differentiation is obtained through the addition of small letters after the year (p.ex. Barros 2017a, 2017b). The order of citation in the text should be chronological (p.ex. Barbosa et al. 2003, Armien et al. 2004).

j) All cited articles should be consulted in full text; if not possible, the original reference is put into the text as p.ex. Bancroft (1921); but in the List of References this should appear as: Bancroft 1921. .... title. ... journal .... (Apud Suvarna & Layton 2013). The consulted reference should be also included in full in the List.

k) The use of “personal communication” and “non-published data” should be exceptional and cited in the text as Author and Year, and in the List of References as p.ex. Barbosa 2016. Personal Communication (Universidade Federal do Pará, campus Castanhal, Brazil).

l) Figure captions (p.ex. “Fig.3. ....”) should be sufficiently informative for understanding (because Figures are independent from the text).

m) The Title of Tables should be written in bold and the Heading (titles of the columns) should be in clear (not bold), written in capital and small letter and separated by two long horizontal lines. There are no vertical lines and no grey bottom; exceptionally can exist horizontal lines. The calls for footnotes should be in small letters or other signs, but not in Arabic numbers. Tables should be submitted in Word (not as images) to allow corrections according to the style of the journal.

n) Complex data should be presented as graphics (but named Figures) in 2D without grey bottom and horizontal lines. Graphics including text should be written with Cambria at 10 pitch.

### 3. Figure presentation:

- a) Save images at 300 dpi, TIF files.
- b) Send each figure separately.
- c) Identify figures in the order in which they are mentioned in the text.
- d) Individual figures must have their files named as (Fig.1, Fig.2, ...).

e) Images that will compose a plate must have their files identified as (Fig.1A, Fig.1B, ...). Plates should be comprised by multiple images, and all images must have the same dimensions.

f) Use preferably scale bars for micrographs. For optical micrographs indicate at the legend finally the staining method and the objective used, for example: HE, obj.40x.

g) Figure legends should contain initially what is seen on the image, followed by additional information (Legend example: Fig.1. (A) Sentence description. Diagnosis, organ or tissue, animal species, case number. Staining method and objective used.).

h) Figure legends should be presented in the main document, after the References.

4. All references cited in the text should be included in the List of References; before the submission of the paper, discrepancies have to be corrected by the author (as the system ScholarOne blocks automatically if such discrepancies exist).

#### **Exemples for References:**

Articles published in scientific journals:

Ubiali D.G., Cruz R.A., De Paula D.A., Silva M.C., Mendonça F.S., Dutra V., Nakazato L., Colodel E.M. & Pescador C.A. 2013. Pathology of nasal infection caused by *Conidiobolus lamprauges* and *Pythium insidiosum* in sheep. *J. Comp. Pathol.* 149(2/3):137-145.

Hooiveld M., Smit L.A., Wouters I.M., Van Dijk C.E., Spreeuwenberg P., Heederik D.J. & Yzermans C.J. 2016. Doctor-diagnosed health problems in a region with a high density of concentrated animal feeding operations: a cross-sectional study. *Environ. Health* 17:15-24.

(Note: The first letters of the words in the title of papers published in journals are small. It is preferable to indicate the number of the respective issue.)

### **Books:**

Marsh P. & Martin M. 1992. *Oral Microbiology*. 3rd ed. Chapman and Hall, London, p.167-196. Tokarnia C.H., Brito M.F., Barbosa J.D., Peixoto P.V. & Döbereiner J. 2012. *Plantas Tóxicas do Brasil para Animais de Produção*. 2ª ed. Helianthus, Rio de Janeiro, p.305-348. (Note: The first letter in the words of the title of books should be capital.)

### **Chapters of books:**

Uzal F.A., Plattner B.L. & Hostetter J.M. 2016. Alimentary system, p.1-257. In: Maxie M.G. (Ed.), *Jubb, Kennedy and Palmer's Pathology of Domestic Animals*. Vol.2. 6th ed. Elsevier, St Louis, Missouri.

Barros C.S.L. 2007. Doenças víricas: leucose bovina, p.159-169. In: Riet-Correa F., Schild A.L., Lemos R.A.A. & Borges J.R.J. (Eds), Doenças de Ruminantes e Equídeos. Vol.1. 3ª ed. Pallotti, Santa Maria, RS.

Tokarnia C.H., Brito M.F., Barbosa J.D., Peixoto P.V. & Döbereiner J. 2012. Plantas que afetam o funcionamento do coração, p.27-94. In: Ibid. (Eds), Plantas Tóxicas do Brasil para Animais de Produção. 2ª ed. Helianthus, Rio de Janeiro.

### **Dissertations and Theses:**

Rech R.R. 2007. Alterações no encéfalo de bovinos submetidos à vigilância das encefalopatias espongiformes transmissíveis. Tese de Doutorado, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria. 228p.

(Note: Use articles which originated from dissertations or theses instead of these).

### **Abstracts published in Events:**

Massa A.T., Potter K.A. & Bradway D. 2016. Epizootic bovine abortion outbreak in Eastern Nevada cattle. Annual Meeting American College of Veterinary Pathologist (ACVP), New Orleans, Louisiana. (Abstract D-50)

Mendonça F.S., Almeida V.M., Albuquerque R.F., Chaves H.A.S., Silva Filho G.B., Braga T.C., Lemos B.O. & Riet Correa F. 2016. Paralisia laríngea associada à deficiência de cobre em caprinos no semiárido de Pernambuco (IX Endivet, Salvador, BA). *Pesq. Vet. Bras.* 36(Supl.2):50-51. (Resumo)

Pierezan F., Lemos R.A.A., Rech R.R., Rissi D.R., Kommers G.D., Cortada V.C.L.M., Mori A.E. & Barros C.S.L. 2007. Raiva em equinos. Anais XIII Encontro Nacional de Patologia Veterinária, Campo Grande, MS, p.145-146. (Resumo)

(Note: Consult entire papers instead of only Abstracts)