

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 24/09/2020.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

MIOTONIA CANINA HEREDITÁRIA: CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS,
ELETROMIOGRÁFICAS E ESTUDO MOLECULAR NO GENE *CLCN1*

DAIANE DE JESUS RODRIGUES

BOTUCATU - SP

2019

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

MIOTONIA CANINA HEREDITÁRIA: CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS,
ELETROMIOGRÁFICAS E ESTUDO MOLECULAR NO GENE *CLCN1*

DAIANE DE JESUS RODRIGUES

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista para obtenção do título de Mestre em Medicina Veterinária.

Orientador: Prof. Dr. Alexandre Secorun Borges

Coorientador: Prof. Dr. José Paes de Oliveira Filho

BOTUCATU - SP

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

Rodrigues, Daiane de Jesus.

Miotonia canina hereditária : características clínicas, eletromiográficas e estudo molecular no gene *CLCN1* / Daiane de Jesus Rodrigues. - Botucatu, 2019

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

Orientador: Alexandre Secorun Borges

Coorientador: José Paes de Oliveira Filho

Capes: 50501062

1. Cães - Doenças. 2. Miotonia. 3. Eletromiografia. 4. Músculo esquelético. 5. Mutação.

Palavras-chave: American Bulldog; Canal de cloro; Eletromiografia; Músculo esquelético; Mutação.

Nome do Autor: Daiane de Jesus Rodrigues

Título: MIOTONIA CANINA HEREDITÁRIA: CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS, ELETROMIOGRÁFICAS E ESTUDO MOLECULAR NO GENE *CLCN1*

COMISSÃO EXAMINADORA

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

Prof. Dr. João Pessoa Araújo Júnior
Membro
Departamento de Microbiologia e Imunologia
Instituto de Biociências de Botucatu

Prof. Dr. Diego José Zanzarini Delfiol
Membro
FAMEV – UFU - Uberlândia

Data da defesa: 24 de setembro de 2019.

Agradecimentos

Gratidão à Deus por cada dia que me é concedido, pela saúde, pelas pessoas que Ele colocou em minha vida e a quem guarda em todo o tempo, gratidão pelas experiências, aprendizado e conquistas a mim concedidas.

Agradeço à minha família pelo amor, cuidado, amparo, força e compreensão. Gratidão aos meus pais, Elton Rodrigues e Célia Silva de Jesus, porquanto têm feito dos meus sonhos os deles e não mediram esforços para me permitir persistir nos dias difíceis, mantendo palavras de encorajamento mesmo quando a saudade e as preocupações ocupavam robustos espaços em suas mentes.

Agradeço aos meus irmãos, Everton, Elaine e Fernanda, e cunhados, Oscar e Vinicius, pelo apoio e por preencherem minha vida e construírem muito do que sou.

Ao meu sobrinho, Arthur, por me ensinar o verdadeiro sentido da vida, da humildade, do amor e a importância de um sorriso, tão pequeno e com tanto a ensinar!

Aos amigos, Luís Nigro, Jéssica Schaffer, Aisni Mayumi, Débora Buss, Laís Cecluski, Aline Adam, Mayhume Narok, Thaís Fonseca, Bruno Battistel, Lucas Deolindo, Evelin Marino, Lucas Slongo, Luan Sapelli, e aos novos amigos que Botucatu e Londrina me proporcionaram, que são fontes inesgotáveis de motivação.

Aos professores e demais colaboradores da Universidade Federal do Paraná pela base sólida que recebi para que tivesse condições de assumir o desafio da Pós-Graduação.

Ao Professor Alexandre Secorun Borges, por acreditar em mim e me conceder a oportunidade desta conquista, sempre terá minha admiração.

Ao meu co-orientador, Professor José Paes de Oliveira Filho, pela ajuda, disposição, compreensão e orientações.

Ao Doutor César Erineudo Tavares de Araújo, pela paciência e disposição em me ensinar, pelas conversas, orientações e palavras de ânimo e incentivo.

Aos meus colegas de Pós-Graduação, Anelize de Souza Trecenti, Danilo Giorgi Abranches de Andrade, Campo Amor Vieira da Cunha Neto, Roberta Martins Basso, Larissa Andrade, Raíssa Leite, Ana Luísa Holanda de Albuquerque e

colaboradoras, Domingas Fernandes e Cristina Castro, pelas conversas, ensinamentos, companhia, auxílio e momentos de descontração.

Ao Professor Rogério Martins Amorim por todo ensinamento durante o período de mestrado.

Ao Professor João Pessoa Araújo Júnior e toda equipe do Instituto de Biotecnologia (IBTEC) pela contribuição em uma importante etapa do projeto.

Aos demais professores e colaboradores da Universidade Estadual Paulista, Campus de Botucatu, que são responsáveis pela manutenção e desenvolvimento humano e científico desta instituição de tamanho renome e solidez.

Ao Professor Adilson Donizeti Damasceno que inicialmente identificou o problema, iniciou a investigação clínica, contatou a Universidade Estadual Paulista e principiou a idealização deste projeto. Agradeço também pela imensa colaboração na execução deste trabalho.

À Dra. Sandra Regina Torelli e ao Professor Dr. Luiz Antônio de Lima Resende por contribuírem ativamente com este projeto de pesquisa.

Ao Professor Diego José Zanzarini Delfiol por ser tão solícito e pela disponibilidade em colaborar na captação de materiais para a execução deste projeto de pesquisa.

Ao Wéverton Ferreira Silva por se dispor a incluir seus cães no projeto. E à Luine Gabriela Hilário Fonseca por disponibilizar imagens do principal cão em estudo e auxiliar na busca por cães que pudessem ser incluídos na pesquisa.

Aos animais submetidos ao projeto, deixo meu agradecimento e dedicação.

Aos tutores dos animais envolvidos na pesquisa, sou imensamente grata pela sensibilidade e interesse com os estudos que ampliam as fronteiras da medicina veterinária e fortalecimento da raça *American Bulldog*.

À CAPES, por propiciar a realização deste trabalho. O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação De Aperfeiçoamento De Pessoal De Nível Superior – Brasil (CAPES) – código de financiamento 001.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1: Traçados eletromiográficos com aumento e diminuição da amplitude e frequência de ondas, característicos da descarga miotônica presente na miotonia hereditária (Adaptado de PRESTON; SHAPIRO, 2013). 13

FIGURA 2: Heredograma com identificação das amostras e grau de parentesco dos dez cães vinculados ao cão número 1. As formas não hachuradas correspondem as amostras disponibilizadas para o estudo. Cães machos foram representados pelos quadrados e fêmeas por círculos. As amostras correspondem ao pai (2), mãe (3), tia (4), irmãos (5,6,7 e 8), sobrinha (9) e cães cujo avô é um ancestral comum (10 e 11). 22

FIGURA 3: Cão da raça *American Bulldog* apresentando miotonia hereditária. **A.** A vista cranial exibe hipertrofia muscular nos membros torácicos. **B - C.** Vista lateral, presença de hipertrofia generalizada pronunciada na musculatura do pescoço e região proximal dos membros torácicos e pélvicos. **D.** Vista da região posterior demonstrando hipertrofia muscular dos membros pélvicos. 30

FIGURA 4: Traçados eletromiográficos em padrão crescente-decrescente de ondas, característicos de miotonia hereditária. Os eixos verticais representam a intensidade (uV) e os eixos horizontais correspondem a medida de tempo (ms/div). **A - B.** Descargas miotônicas são observadas com o aumento e diminuição da amplitude e frequência, 250 e 50 ms/div correspondem, respectivamente, ao tempo de análise. A intensidade em A é de 50 uV e em B é de 500 uV. **C-D.** Sequencia sustentada de ondas positivas e picos negativos, respectivamente, com tempo de análise de 20ms/div. 31

FIGURA 5: Localização da mutação NM_001003124.2: c.436_437insCTCT no cão afetado pela miotonia hereditária, em comparação ao gene referência e ao cão controle negativo. 32

FIGURA 6: Alinhamento da sequência da proteína CLC-1 humana (Human_6QVC) e a sequência proteica predita a partir da sequência codificante do animal miotônico (Myotonic_dog_CLC1). Estruturas secundárias são indicadas acima do aminoácido sequência. As hélices alfas foram nomeadas de acordo com a estrutura cristalográfica de raios-x proposta por FENG et al. (2010), resíduos conservados são ressaltados em preto. As barras amarelas representam diferentes aminoácidos a partir do ponto de inserção (NM_001003124.2: c.436_437insCTCT).

O asterisco ressaltado em vermelho representa o stop códon prematuro formado (M194X). Em verde estão representados os principais aminoácidos que participam da formação do poro condutor seletivo para o íon Cl⁻ (S189, E232 e Y578). Na sequência Myotonic_dog_CLC1 em S189 ocorre uma substituição do resíduo de Serina (S) por um resíduo de Triptofano (W) e a ausência de E232 e Y578..... 35

FIGURA 7: Gel de agarose com produtos de PCR das amostras de cDNA *wildtype* e Miotônico, abrangendo as regiões do gene correspondentes aos éxons 4,5,6 e 7. A banda dupla com produtos de aproximadamente 500 e 600 pb é observada apenas no cDNA do cão miotônico. A coluna 1 corresponde ao *ladder* de 100 pb; coluna 2, amostra cDNA cão *wildtype*; coluna 3, controle negativo; coluna 4, amostra de cDNA do cão miotônico; coluna 5, controle negativo para a amostra do cão afetado; coluna 6, amostra de cDNA cão *wildtype*; coluna 7, amostra cão miotônico 36

FIGURA 8: Recorte de região do gene *CLCN1* em cães, abrangendo éxon 6, íntron 6, éxon 7, *primers forward e reverse* utilizados para amplificação da região de inserção de bases e região intrônica inserida no transcrito alternativo do cão afetado. 37

FIGURA 9: Região de junções éxon 6 e éxon 7 obtidas através do alinhamento das sequências NM_001003124.2, RNAm de cão *wildtype* e cão miotônico. No RNAm do cão miotônico, 79 nucleotídeos “ACCGCGTCTGGGCAGCTTGATCTCCTGGTGTTCGGCCTGCGCGGTGGGCGTGG GATGCTGCTTTGCAGCCCCTGTTCGGAG” foram inseridos na junção éxon 6 e éxon 7 - NC_006598.3 (NM_001003124.2): c.774_775ins [6442_6520]. 38

FIGURA 10: Heredograma da família do cão American Bulldog afetado pela miotonia hereditária. As formas não hachuradas correspondem as amostras disponibilizadas para o estudo. Cães machos foram representados pelos quadrados e fêmeas por círculos. As formas completamente preenchidas são dos animais miotônicos. Os quadrados ou círculos parcialmente preenchidos são de cães heterozigotos para a mutação NM_001003124.2: c.436_437insCTCT. As formas vazias correspondem a cães *wildtype*. 39

FIGURA 11: Eletroferograma do cão miotônico, recessivo para a mutação NM_001003124.2: c.436_437insCTCT, e do cão *wildtype* em comparação a dois cães heterozigotos para a mutação: Cão 5 (irmã) e Cão 3 (mãe). Picos duplos são observados apenas no eletroferograma dos cães heterozigotos. 40

LISTA DE TABELAS

TABELA 1: Sequencia referência NC_006598.3 (NM_001003124.2):
Localização e tamanho, em número de pares de bases, dos 23 exóns, do gene
CLCN1 na espécie *Canis familiaris* (NCBI - Gene ID: 403723)..... 10

TABELA 2: Identificação e tamanho dos *primers* utilizados para
sequenciamento do gene *CLCN1*, bem como abrangência de cada região
amplificada por seu respectivo par de *primer*. 27

LISTA DE ANEXOS

ANEXO A - Autorização pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da FMVZ-UNESP (protocolo nº 0173/2018).	89
ANEXO B - SEQUENCIAS DE CÓDONS PARA <i>CHLORIDE CHANNEL PROTEIN 1</i>	90

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

MH	Miotonia hereditária
CLCN1	<i>Voltage-dependent chloride channel</i>
CLC-1	Canal de Cloro 1
DNA	Ácido desoxirribonucleico
Cl⁻	Cloro
CLC	Canal de Cloro
DM1	Distrofia Miotonica Tipo 1
DM2	Distrofia Miotonica Tipo 2
HYP	Paralisia Periodica Hipercalemica
PC	Paramiotonia congênita
SCN4A	<i>Sodium channel protein type 4 subunit alpha</i>
WT	<i>Wildtype</i>
EMG	Eletromiografia
CEUA	Comissão de ética no uso de animais
UNESP	Universidade Estadual Paulista
UFG	Universidade Federal de Goiás
RNA	Ácidoribonucleico
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
FMVZ	Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
°C	Graus Celsius
Cm	Centímetros
ml	Mililitro

μL	Microlitro
μg	Micrograma
mg	Miligrama
Kg	Quilograma
μm	Micrômetro
Pb	Pares de bases
PCR	Reação em cadeia da polimerase

SUMÁRIO

RESUMO	1
ABSTRACT	2
CAPÍTULO I	3
1. INTRODUÇÃO	4
2. REVISÃO DE LITERATURA	6
2.1. Aspectos Gerais da Miotonia	6
2.2. Miotonia Não Distrófica	7
2.2.1. Canais de Cloro	9
2.2.1.1. Canais de cloro CLC-1	9
2.2.2. Miotonia hereditária	11
2.2.3. Miotonia Hereditária em Humanos	13
2.2.4. Miotonia Hereditária em Animais	14
2.2.4.1. Cabra: O mais antigo modelo animal da síndrome miotônica	14
2.2.4.2. Miotonia não distrófica em outras espécies animais	15
2.2.4.3. Miotonia hereditária em cães	17
2.3. <i>American Bulldog</i> : Características da raça	19
3. OBJETIVOS	20
3.1. Objetivo Geral:	20
3.2. Objetivos específicos:	20
4. MATERIAL E MÉTODOS	21
4.1. Animais experimentais	21
4.2. Exame físico, exame de EMG e histopatológico	22
4.3. Colheita das amostras experimentais	23
4.3.1. Amostras de sangue	23
4.3.2. Biópsia Muscular	24
4.4. Avaliação do gene <i>CLCN1</i>	25

4.4.1. Extração de DNA	25
4.4.2. Purificação do RNA e confecção do cDNA	25
4.4.3. Sequenciamento do RNAm do gene <i>CLCN1</i>	26
4.4.3.1. <i>Primers</i>	26
4.4.3.2. Reação em Cadeia da Polimerase	27
4.4.3.3. Gel de Eletroforese	27
4.4.4. Genotipagem	28
4.4.4.1. Purificação do DNA	28
4.4.4.2. Sequenciamento gênico	28
4.5. Análise dos Dados	29
5. RESULTADOS	29
5.1. Exame físico	29
5.2. Eletromiografia e Histopatologia	30
5.3. Sequenciamento do RNAm do <i>CLCN1</i>	32
5.4. Genotipagem de <i>American Bulldogs</i> aparentados com o cão afetado	39
5.5. Genotipagem de amostras de cães da raça <i>American Bulldog</i>	40
6. DISCUSSÃO	41
7. CONCLUSÃO	45
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	47
CAPÍTULO II	60
Trabalho redigido para submissão na revista “Skeletal Muscle Journal”	61
ANEXOS	89

RESUMO

A miotonia hereditária (MH) é uma enfermidade muscular hereditária não distrófica. Manifesta-se pela presença de hipertrofia muscular e miotonia que melhora com o exercício, fenômeno conhecido como “*warm-up*”. As alterações clínicas estão associadas a mutações no gene *CLCN1*, codificador do canal seletivo para o íon cloreto da musculatura esquelética. A enfermidade já foi descrita em diversas espécies e algumas raças caninas; no entanto, esta é primeira descrição de MH em cães da raça *American Bulldog*. Quarenta e quatro cães da raça *American Bulldog* foram empregados na pesquisa, constituindo três grupos de estudo. O primeiro grupo, compreendeu um cão, da raça *American Bulldog*, com cinco meses de idade, que foi avaliado sob aspectos clínicos, eletromiográficos e moleculares. Os sinais de hipertrofia muscular, miotonia e fenômeno “*warm-up*” foram evidentes. Durante o exame de eletromiografia (EMG) foram verificadas a presença de descargas miotônicas. Foi verificada uma mutação “*frameshift*”, NM_001003124.2: c.436_437insCTCT, no gene *CLCN1*. A presença do transcrito alternativo NC_006598.3 (NM_001003124.2): c.774_775ins [6442_6520] foi observada no RNAm do cão miotônico. O segundo grupo constituiu-se de dez cães geneticamente relacionados com o cão do primeiro grupo. Por fim, o terceiro grupo compreendeu 33 cães não relacionados entre si e com os cães de outros grupos. Heterozigotos, cães *wildtype* e outro cão afetado para a mutação NM_001003124.2: c.436_437insCTCT foram observados dentre os dez cães geneticamente relacionados. Todos os cães do terceiro grupo foram considerados *wildtype* para a mutação descrita. Foi padronizado um teste molecular diagnóstico da miotonia hereditária para a mutação NM_001003124.2: c.436_437insCTCT, utilizando o método de sequenciamento Sanger. O teste molecular poderá ser utilizado na orientação de acasalamentos. O estudo contribui para a compreensão da fisiopatogenia da MH, ampliação do espectro de mutações no gene *CLCN1* relacionadas a enfermidade e constitui a primeira descrição da MH em cães da raça *American Bulldog*.

Palavras-chave: Canal de cloro, músculo esquelético, eletromiografia, mutação, *American Bulldog*.

ABSTRACT

Hereditary Myotonia (HM) is an inherited non-dystrophic muscle disease. It is manifested by the muscular hypertrophy and myotonia that improves with exercise, a phenomenon known as "warm-up". Clinical features are associated with mutations in the *CLCN1* gene, that encodes the selective channel for the skeletal muscle chloride ion. The HM has been described in several species and some dog breeds; however, this is the first report of HM in American Bulldog. The objective of this research was to describe clinical abnormalities, electromyographic and molecular characterization of hereditary myotonia in dog of this breed. 44 American Bulldog were used in the research, constituting 3 study groups. The first group included an American Bulldog, 5 months old, was evaluated under clinical, electromyographic and molecular aspects. Signs of muscle hypertrophy, myotonia, and warm-up were present. During the electromyography exam (EMG) myotonic discharges were observed. A frameshift mutation, NM_001003124.2: c.436_437insCTCT, was verified in the *CLCN1* gene. The presence of an alternative transcript NC_006598.3 (NM_001003124.2): c.774_775ins [6442_6520] was observed in the myotonic dog mRNA. The second group consisted of ten dogs genetically related to the dog of the first group. Finally, the third group included 33 unrelated dogs and dogs from other groups. Heterozygotes, wildtype dogs and another dog affected by mutation NM_001003124.2: c.436_437insCTCT were observed among the ten genetically related dogs. All dogs of the third group were considered wildtype for the mutation described. A genetic test of hereditary myotonia for the mutation NM_001003124.2: c.436_437insCTCT was standardized by the Sanger sequencing method. Molecular testing can be used to guide mating. The study contributes to the understanding of the pathophysiology of HM by broadening the spectrum of mutations in the *CLCN1* gene related to illness and constitutes the first description of HM in American Bulldog.

Keywords: Chloride channel, skeletal muscle, electromyography, mutation, American Bulldog.

CAPÍTULO I

1. INTRODUÇÃO

O músculo esquelético constitui um dos mais dinâmicos tecidos do corpo humano, representa cerca de 40% do peso corporal e contém aproximadamente 50-75% de todas as proteínas do corpo. O equilíbrio entre a síntese e a degradação proteica asseguram adequada funcionalidade do tecido. No entanto, fatores como o estado nutricional, desequilíbrio hormonal, exercício, lesão ou doenças podem desestabilizar o sistema neuromuscular (FRONTERA; OCHALA, 2015).

A presença de miotonia destaca-se em algumas enfermidades como a principal manifestação de distúrbios no músculo esquelético (PEDROSA *et al.*, 2018). A miotonia é um sinal clínico decorrente do retardo no relaxamento da musculatura esquelética após contração voluntária, estímulo elétrico ou mecânico (DEWEY; TALARICO, 2017). Este sinal está associado a miopatias que podem ser distróficas ou não distróficas e podem ter caráter adquirido ou hereditário (MATTHEWS *et al.*, 2010).

Em humanos, existem dois tipos de miotonias distróficas, a do tipo 1 (DM1) e a do tipo 2 (DM2). As miotonias não distróficas são classificadas em dois grandes grupos, as que afetam os canais de cloro e as que ocasionam disfunções dos canais de sódio (MONTAGNESE; SCHOSER, 2018). A paralisia periódica hipercalêmica (HYPP), a paramiotonia congênita (PC) e a miotonia agravada pelo potássio são canalopatias relacionadas aos distúrbios do canal de sódio (KUBOTA *et al.*, 2009; SCHNEIDER-GOLD *et al.*, 2018). A principal enfermidade causada pela disfunção do canal de cloreto é a miotonia hereditária (COLDING-JORGENSEN, 2005).

Dentre as doenças miotônicas não distróficas hereditárias, a miotonia hereditária (MH) constitui uma enfermidade que impacta na mobilidade das pessoas, afetando a qualidade de vida (MEYER-KLEINE *et al.*, 1995). Clinicamente, a MH caracteriza-se pelo aparecimento da miotonia após o início de um movimento e tende a melhorar após repetidas movimentações, fenômeno conhecido como “*warm-up*”. Observa-se, na maioria dos pacientes, o desenvolvimento de hipertrofia muscular. A MH decorre de mutações no gene *CLCN1*, codificador do canal seletivo para o íon cloreto no tecido muscular esquelético (CLC-1) (MENG *et al.*, 2016).

Dentre as espécies animais com descrições de MH estão búfalos (BORGES *et al.*, 2013), cabras (BECK; FAHLKE, 1996), cães (RHODES *et al.*, 1999;

FINNIGAN *et al.*, 2007), camundongos (STEINMEYER *et al.*, 1991a; PAPIZAN *et al.*, 2017), cavalos (WIJNBERG *et al.*, 2012), gatos (TOLL *et al.*, 1998; HICKFORD *et al.*, 1998; GASCHEN *et al.*, 2004; GANDOLFI *et al.*, 2014), ovelhas (MONTEAGUDO *et al.*, 2015) e suínos (ARAÚJO *et al.*, 2017).

Em cães, foram feitas descrições da miotonia hereditária nas raças *Staffordshire terrier* (SHIRES *et al.*, 1983), *Chow Chow* (AMANN *et al.*, 1985; SHORES *et al.*, 1986), *Great Dane* (HONHOLD; SMITH, 1986), *Cocker Spaniel* (HILL, 1995), *Schnauzer Miniatura* (RHODES *et al.*, 1999; VITE *et al.*, 1999), *Australian cattle dog* (FINNIGAN *et al.*, 2007), *Jack Russell terrier* (LOBETTI, 2009), *Border Collie* e *West Highland White Terrier* (DEWEY; TALARICO, 2017) e *Labrador Retriever* (QUITTT *et al.*, 2018).

Recentemente, um cão da raça *American Bulldog*, com 5 meses de idade, foi atendido pelo professor Dr. Adilson Donizeti Damasceno, neurologista que atua na Escola de Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal de Goiás (HV/EVZ/UFG), e recebeu o diagnóstico presuntivo de miotonia hereditária. Diante da suspeita clínica, o professor contatou o Laboratório de Biologia Molecular do Departamento de Clínica Veterinária, da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP), Campus Botucatu, para realização de análise genética a fim de confirmar o diagnóstico.

O presente estudo teve o objetivo de caracterizar a miotonia hereditária em cães da raça *American Bulldog*. O modelo deste estudo poderá contribuir para a avaliação de variabilidade genotípica e fenotípica da MH entre diferentes espécies, como a espécie humana, por exemplo.

7. CONCLUSÃO

Este estudo constitui a primeira descrição clínica e molecular de miotonia hereditária em cães da raça *American Bulldog*. O histórico familiar, os sinais clínicos, achados eletromiográficos e moleculares confirmam a suspeita diagnóstica. Animais geneticamente relacionados foram genotipados e indivíduos heterozigotos foram identificados, bem como outro cão afetado pela miotonia. Progenitores não são afetados, sendo heterozigotos para a mutação NM_001003124.2:

c.436_437insCTCT no gene *CLCN1*, caracterizando a MH de padrão de herança

autossômico recessivo. A análise de Pedigree e o estudo genealógico confirmam a presença de um ancestral comum entre os indivíduos afetados e heterozigotos.

Um teste molecular foi padronizado para diagnóstico da mutação NM_001003124.2: c.436_437insCTCT, através do método de sequenciamento Sanger, realizado a partir de amostras de DNA. A orientação de acasalamentos de cães da raça *American Bulldog* poderá ser realizada a partir do teste molecular desenvolvido neste estudo.

Os resultados deste estudo ampliam o conhecimento sobre o desenvolvimento e as causas da miotonia hereditária. A mutação no gene *CLCN1* deverá ser incluída no painel de diagnósticos diferenciais para miopatias de origem genética em cães desta raça.

O desenvolvimento dessa pesquisa implica na expansão da lista de raças afetadas pela miotonia hereditária e possibilita que animais dessa espécie sejam potenciais modelos para doenças genéticas humanas. Por fim, esse trabalho permite a elaboração de estudos futuros para avaliar a prevalência da mutação no Brasil e avaliar se existem diferenças fenotípicas entre os animais acometidos pela MH.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABKC - **American Bully Kennel Club**. Disponível em: <http://theabkcdogs.org/home/breeds/american-bulldog/>. Acesso em 23 de agosto de 2019.

ADRIAN, R.H.; BRYANT, S.H. On the repetitive discharge in myotonic muscle fibres. **J. Physiol.**, 240, p. 505-515, 1974.

AKABOSHI, K., Educational lecture B-13. Fun of needle electromyography, **Clinical Neurophysiology**, v. 129, n. 5, p. 20, 2018.

ALEJO-GONZÁLEZ, M.R. *et al.*, Application of electrophysiological exercise test in patients with congenital myotonia. **Acta Pediatrica Espanola**, v. 74, n. 2, p. 50–56, 2016.

AMANN, J.F.; TOMLINSON J.; HANKISON J.K., Myotonia in a chow chow. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 187, n. 4, p. 415–417, 1985.

AMRITA LAKRAJ, A. *et al.*, Novel Mutations in the CLCN1 gene of myotonia congenita: 2 case reports. **Yale Journal of Biology and Medicine**, v. 86, n. 1, p. 101-106, 2013.

ANDRÉ, L.M. *et al.*, Abnormalities in skeletal muscle myogenesis, growth, and regeneration in myotonic dystrophy. **Frontiers in Neurology**, v. 9, n. MAY, 2018.

ARAÚJO, C.E.T. Estudo da miootonia hereditária em suínos. **Repositório Institucional UNESP**. Botucatu - SP, 2018. Disponível em: https://repositorio.unesp.br/bitstream/handle/11449/155953/araujo_cet_dr_bot_par.pdf?sequence=3&isAllowed=y

BARCHI, R. L., Myotonia: An Evaluation of the Chloride Hypothesis. **Archives of Neurology**, v. 32, n. 3, p. 175-180, 1975.

BAROHN, R. J.; DIMACHKIE, M. M.; JACKSON, C. E. A pattern recognition approach to the patient with a suspected myopathy. **Neurologic clinics**, v. 32, n. 3, p. 569–vii, ago. 2014.

BECK, C.L.; FAHLKE, C; GEORGE Jr, A.L. Molecular basis for decreased muscle chloride conductance in the myotonic goat. **Proc. Natl Acad. Sci. USA**, 93, pp. 11248-11252. 1996.

BECKER, P.E. Myotonia congenita and syndromes associated with myotonia. **Thieme Medical Publishers**; 1977.

BERCHTOLD, M. W.; BRINKMEIER, H.; MUNTENER, M., Calcium Ion in Skeletal Muscle: Its Crucial Role for Muscle Function, Plasticity, and Disease. **Physiological Reviews**, v. 80, n. 3, p. 1215-1265, 2000.

BHALERAO, D. P. *et al.*, Detection of a genetic mutation for myotonia congenita among Miniature Schnauzers and identification of a common carrier ancestor. **Am J Vet Res**. 63: 1443–1447, 2002.

BHANGAV, A.; MANOUSAKIS, G., Atypical presentation of CLCN1 mutations: A case series. **Neurology**, v. 88, n. 16, 2017.

BLENCOWE, B. J., Alternative Splicing: New Insights from Global Analyses. **Cell**, v. 126, n. 1, p. 37-47, 2006.

BORGES, A. S.*et al.*, Clinical and molecular study of a new form of hereditary myotonia in Murrah water buffalo. **Neuromuscul Disord**, v. 23, n. 3, p. 206-13, Mar 2013. ISSN 1873-2364 (Electronic). 0960-8966.

BOZOVIC *et al*, Myotonic dystrophy type 2 as a multisystem disease, **Journal of Neuromuscular Diseases**, v. 5, n. (Bozovic I.; Peric S.; Bjelica B.; Basta I.; Marjanovic A.; Brankovic M.; Kacar A.; Rakocevic-Stojanovic V.) *Neurology Clinic, Clinical Center of Serbia, University of Belgrade, Belgrade, Serbia*, p. S163–S164, 2018.

BRANDT, S.; JENTSCH, T. J. CIC-6 and CIC-7 are two novel broadly expressed members of the CIC chloride channel family. **FEBS Letters**, v. 377, n. 1, p. 15-20, p. 6, 1995.

BRYANT, S. H., MYOTONIA IN THE GOAT, **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 317, n. 1, p. 314-325, 1979.

BRYANT, S. H. Physical basis of myotonia. In: **Disorders of the Motor Unit**, edited by D. L. Schotland. New York: Wiley, p. 381-389, 1982.

- BROWN, G.L.; HARVEY, A.M. Congenital myotonia in the goat. **Brain**, 62, p. 341 – 363, 1939.
- BRUGNONI, R. *et al*, A large cohort of myotonia congenita probands: Novel mutations and a high-frequency mutation region in exons 4 and 5 of the CLCN1 gene. **Journal of Human Genetics**, v. 58, n. 9, p. 581–587, 2013.
- CANNON, S. C. Pathomechanisms in channelopathies of skeletal muscle and brain. **Annu Rev Neurosci**, v. 29, p. 387–415, 2006.
- CHEN, A.V.*et al.*, Confirmed 2,4-dichlorophenoxyacetic acid toxicosis in a dog. **Journal of the American Animal Hospital Association**, v. 46, n. 1, p. 43–47, 2010.
- CLARK, B. J., 2.04 – Control of Gene Expression, *in*: MCQUEEN, Charlene A. (Org). **Comprehensive Toxicology** (Second Edition), Oxford Elsevier, p. 51-69, 2010.
- COLDING-JORGENSEN, E. Phenotypic variability in myotonia congenita. **Muscle Nerve**, 32:19–34, 2005.
- DEWEY, C.W. **Disorders of the Peripheral Nervous System**. In: 50° Congresso Nazionale Multisala SCIVAC – Rimini, Italia, 2005.
- DEWEY, C.W.; TALARICO, L.R. Miopatias: distúrbios dos músculos esqueléticos. In: DEWEY, C.W.; COSTA, R.C. **Neurologia Canina e Felina - Guia Prático**. 1ª ed. São Paulo: Editora Guará Ltda. p.545-589, 2017.
- DONNER, J.*et al.*, Genetic panel screening of nearly 100 mutations reveals new insights into the breed distribution of risk variants for canine hereditary disorders. **PLoS One**. 11: e0161005, 2016.
- DROST, G. *et al*, Myotonic discharges discriminate chloride from sodium muscle channelopathies, **Neuromuscular Disorders**, v. 25, n. 1, p. 73–80, 2015.
- DUFFIELD, M. *et al.*, Involvement of helices at the dimer interface in CIC-1 common gating. **J. Gen. Physiol.**, 121 pp. 149-161, 2003.
- DUTZLER, R. *et al.*, X-ray structure of a CIC chloride channel at 3.0 Å reveals the molecular basis of anion selectivity. **Nature**, v. 415, n. 6869, p. 287-294, 2002.
- DZAKUMA, J.; RISCH, E. The Potential of Tennessee Stiff-Legged Goats. In Meat Production. **ResearchGate**, [s.l.: s.n.], 1996. Disponível em

https://www.researchgate.net/publication/288824893_THE_POTENTIAL_OF_TENNESSEE_STIFF-LEGGED_GOATS_TS_IN_MEAT_PRODUCTION

ENSEMBL:chloride voltage-gated channel 1 [Source:VGNC Symbol;Acc:VGNC:39301]. Location :Chromosome 16: 6,342,772-6,373,580 reverse strand. (CanFam3.1:CM000016.3). Disponível em<https://www.ensembl.org/Canis_familiaris/Gene/Sequence?db=core;g=ENSCAFG00000003619;r=16:6342772-6373580;t=ENSCAFT00000020333>

FAHLKE, C.; BECK, C.L.; GEORGE Jr, A.L., A mutation in autosomal dominant myotonia congenita affects pore properties of the muscle chloride channel. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 94, n. 6, p. 2729–2734, 1997.

FENG, L. *et al.*, Structure of a eukaryotic CLC transporter defines an intermediate state in the transport cycle. **Science (New York, N.Y.)**, v. 330, n. 6004, p. 635–641, out. 2010.

FINNIGAN, D. F. *et al.*, A novel mutation of the CLCN1 gene associated with myotonia hereditaria in an Australian cattle dog. **J Vet Intern Med**, v. 21, n. 3, p. 458-63. ISSN 0891-6640 (Print). 0891-6640 (Linking), May-Jun 2007.

FRANKE, C. *et al.*, Altered Na⁺ channel activity and reduced Cl⁻ conductance cause hyperexcitability in recessive generalized myotonia (Becker). **Muscle Nerve**, 14 pp. 762-770. 1991.

FRONTERA, W. R; OCHALA, J. **Calcif Tissue Int.** 96: 183, 2015. <https://doi.org/10.1007/s00223-014-9915->

FURUYA, M. *et al.*, Splice-site mutation causing partial retention of intron in the FLCN gene in Birt-Hogg-Dubé syndrome: a case report, **BMC Medical Genomics**, v. 11, n. 1, p. 42, 2018.

GALANTE, P. A. *et al.*, Detection and evaluation of intron retention events in the human transcriptome. **RNA** 2004; **10**:757-765

GANDOLFI, B. *et al.*, A novel mutation in CLCN1 associated with feline myotonia congenita. **PLOS ONE**, San Francisco, USA. Published: October 30, 2014. Disponível

em:<http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0109926>. Acesso em 10 de março de 2018.

GASCHEN, F.; JAGGY, A.; JONES, B. Congenital diseases of feline muscle and neuromuscular junction. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v. 6, n. 6, p. 355–366, 2004.

GEORGE, A. L. *et al.*, Molecular basis of Thomsen's disease (autosomal dominant myotonia congenita). **Nat Genet.** 3: 305–310, 1993.

GRACIS, M.; KEITH, D.; VITE, C.H. Dental and craniofacial findings in eight miniature schnauzer dogs affected by myotonia congenita: preliminary results., **Journal of veterinary dentistry**, v. 17, n. 3, p. 119–127, 2000.

GRIFFITHS, A. J. F. *et al.* **Introdução à genética**. 11. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2016.

GRONEMEIER, M. *et al.*, Nonsense and missense mutations in the muscular chloride channel gene Clc-1 of myotonic mice. **J. Biol. Chem.**, 269 (1994), pp. 5963-5967. 1994.

GUTMANN, L.; PHILLIPS, L. H. 2nd. Myotonia congenita. **Semin Neurol**; 11: 244-248, 1991.

HAYWARD, L. J. *et al.* Targeted mutation of mouse skeletal muscle sodium channel produces myotonia and potassium-sensitive weakness. **The Journal of clinical investigation**, v. 118, n. 4, p. 1437-1449, 2008.

HICKFORD, F.H. *et al.*, Congenital myotonia in related kittens., **The Journal of small animal practice**, v. 39, n. 6, p. 281–285, 1998.

HILL, S.L.; SHELTON, G.D.; LENEHAN, T.M., Myotonia in a cocker spaniel., **Journal of the American Animal Hospital Association**, v. 31, n. 6, p. 506–509, 1995.

HONHOLD, N.; SMITH, D.A. Myotonia in the great dane. **Vet Rec.**; 119: 162, 1986.

HOPPE, K. *et al.*, Elevation of extracellular osmolarity improves signs of myotonia congenita in vitro: a preclinical animal study, **Journal of Physiology**, v. 597, n. 1, p. 225–235, 2019.

HUDSON, A. J.; BULMAN, D. E.; EBERS, G. C., The skeletal muscle sodium and chloride channel diseases. **Brain**, v. 118, n. 2, p. 547-563, 1995.

IMBRICI, P. *et al*, CIC-1 chloride channels: State-of-the-art research and future challenges. **Frontiers in Cellular Neuroscience**, v. 9, n. APR, 2015a.

IMBRICI, P. *et al*, Genotype-phenotype relationship in myotonia congenita caused by CLCN1 mutations: What we have done and future therapeutic challenges for precision medicine. **Acta Myologica**, v. 37, n. 1, p. 73–74, 2018.

IMBRICI, P. *et al*, CIC-1 mutations in myotonia congenita patients: Insights into molecular gating mechanisms and genotype-phenotype correlation, **Journal of Physiology**, v. 593, n. 18, p. 4181–4199, 2015b.

JENTSCH, T. J.; STEINMEYER, K.; SCHWARZ, G. Primary structure of Torpedo marmorata chloride channel isolated by expression cloning in *Xenopus oocytes*. **Nature**, v. 348, n. 6301, p. 510–514, dez. 1990.

JENTSCH, T.J., Discovery of CLC transport proteins: Cloning, structure, function and pathophysiology. **Journal of Physiology**, Leibniz-Institut für Molekulare Pharmakologie (FMP) and Max-Delbrück-Centrum für Molekulare Medizin (MDC) Berlin Germany, 2015.

JING, F. *et al*, Analysis of CLCN1 gene mutations in a family affected with myotonia congenita. **Chinese Journal of Medical Genetics**, v. 35, n. 3, p. 400–402, 2018.

KIM, E.; GOREN, A.; AST, G. Alternative splicing: current perspectives. **BioEssays**. 30(1), 38-47, 2007.

KOCH, M. C. *et al.*, The skeletal muscle chloride channel in dominant and recessive human myotonia. **Science**. 257: 797–800, 1992.

KUBOTA, T. *et al.*, New mutation of the Na channel in the severe form of potassium-aggravated myotonia. **Muscle & Nerve**, v. 39, n. 5, p. 666-673, 2009.

KUSHLAF, H.; QUINLAN, J., A novel chloride channel dna variant producing pregnancy-induced myotonia. **Muscle and Nerve**, v. 56, n. 3, p. 548, 2017.

LEHMANN-HORN, F.; RÜDEL, R. Hereditary nondystrophic myotonias and periodic paralyses. **Current opinion in neurology**, v. 8, n. 5, p. 402-410, 1995.

LENNOX, G.; PURVES, A.; MARSDEN, D. Myotonia Fluctuans, **Archives of Neurology**, v. 49, n. 10, p. 1010-1011, 1992.

LIPICKY, R.J.; BRYANT, S.H. Sodium, Potassium, and Chloride Fluxes in Intercostal Muscle from Normal Goats and Goats with Hereditary Myotonia. Department of Pharmacology, University of Cincinnati, College of Medicine, Cincinnati. **The Journal of General Physiology**. v. 50, 1966.

LIPICKY, R. J. Myotonic syndromes other than myotonic dystrophy. In: Handbook of Clinical Neurology, edited by P. J. Vinken and G. W. Bruyn. Amsterdam: **Elsevier**, vol. 40, p. 533-571. 204, 1979.

LOBETTI, R.G. **Myotonia congenita in a Jack Russell terrier**. Journal of the South African Veterinary Association 80(2): 106–107 (En.). Bryanston Veterinary Hospital, PO Box 67092, Bryanston, 2021. South Africa, 2009.

LOPEZ, A. J. ALTERNATIVE SPLICING OF PRE-RNA_m: Developmental Consequences and Mechanisms of Regulation. **Annual Review of Genetics**, v. 32, n. 1, p. 279-305, 1998.

MATTHEWS, E. *et al.*, the CINCH Investigators; The non-dystrophic myotonias: molecular pathogenesis, diagnosis and treatment, **Brain**, Volume 133, Issue 1, Pages 9–22, 1 January 2010. Disponível em: <<https://doi.org/10.1093/brain/awp294>>

MCCLATCHEY, A. I. *et al.*, Temperature-sensitive mutations in the III-IV cytoplasmic loop region of the skeletal muscle sodium channel gene in paramyotonia congenita. **Cell**, v. 68, n. 4, p. 769-774, 1992.

MEYER-KLEINE, *et al.*, Spectrum of Mutations in the Major Human Skeletal Muscle Chloride Channel Gene (CLCN I). **Am. J. Hum. Genet.** 57:1325-1334, 1995.

MENG, Y.X. *et al.*, Identification of novel mutations of the CLCN1 gene for myotonia congenital in China. **Neurological Research**, v. 38, n. 1, p. 40–44, 2016.

MISHRA, S.K. *et al.*, “Dystrophia Myotonica” and the legacy of hans gustav wilhelm steinert. **Annals of Indian Academy of Neurology**, v. 21, n. 2, p. 116–118, 2018.

MONTAGNESE, F.; SCHOSER, B. Dystrophic and non-dystrophic myotonias, **Fortschritte der Neurologie Psychiatrie**, v. 86, n. 9, p. 575-583, 2018.

MONTEAGUDO, L.V. *et al.*, Ovine congenital myotonia associated with a mutation in the muscle chloride channel gene. **Veterinary Journal**, v. 204, n. 1, p. 128–129, 2015.

NAKKA, K, *et al.*, Diversification of the muscle proteome through alternative splicing. **Skeletal Muscle**, v. 8, n. 1, p. 8, 2018.

NAYLOR, J.M. "Equine hyperkalemic periodic paralysis: review and implications." **The Canadian Veterinary Journal** 35, no. 5: 279, 1994.

NATIONAL KENNEL CLUB. Disponível em: <http://www.nationalkennelclub.com/Breed-Standards/ab-standard.htm>. Acesso em 23 de agosto de 2019.

NCBI - Gene ID: 403723. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/403723>. Acesso em 23 de agosto de 2019.

ODRZYWOLSKI, K.; JOHNSON, N.; TWYDELL, P. Fluctuating ophthalmoplegia presenting as a treatable manifestation of myotonia congenita. **Neurology**, v. 78, n. 1, 2012.

PAPIZAN, J.B.*et al.*, Deficiency in Kelch protein Khl31 causes congenital myopathy in mice. **Journal of Clinical Investigation**, v.127, n.10, p.3730-3740, 2017.

PASSERI, E. *et al.*, Asymptomatic myotonia congenita unmasked by severe hypothyroidism. **Neuromuscular Disorders**, v. 24, n. 4, p. 365–367, 2014.

PEDERSEN, T.H. *et al.*, Role of physiological CIC-1 Cl⁻ ion channel regulation for the excitability and function of working skeletal muscle. **The Journal of general physiology**, v. 147, n. 4, p. 291–308, 2016.

PEDROSA, A. *et al.*, REGISTRIES AND CARE OF NEUROMUSCULAR DISORDERS: P. 285 Validation of the Brazilian Portuguese version of the motor function measure - short form (MFM-20) for neuromuscular diseases in children from two to seven years old, **Neuromuscular Disorders**, v. 28, p. S117, 2018.

PELLEY, J. W., 17 – Protein Synthesis and Degradation, *in*: PELLEY, J. W. **Elsevier's Integrated Biochemistry**, Philadelphia: Mosby, 2007, p. 147-158, 2007.

PELLEY, J. W., 17 – Protein Synthesis and Degradation, *in*: PELLEY, J. W. **Elsevier's Integrated Review Biochemistry** (Second Edition), Philadelphia: W. B. Saunders, p. 149-160, 2012.

PENG, Y.J. *et al.*, Regulation of CLC-1 chloride channel biosynthesis by FKBP8 and Hsp90 β . **Scientific reports**, v. 6, p. 32444, 2016.

POROCA, D.R.; PELIS, R.M.; CHAPPE, V.M., CIC channels and transporters: Structure, physiological functions, and implications in human chloride channelopathies. **Frontiers in Pharmacology**, v. 8, n. MAR, 2017.

PORTARO, S. *et al.*, Clinical, Molecular, and Functional Characterization of CLCN1 Mutations in Three Families with Recessive Myotonia Congenita, **Neuro Molecular Medicine**, v. 17, n. 3, p. 285–296, 2015.

PRESTON, D.C.; SHAPIRO, B.E., Electromyography and neuromuscular disorders. **Elsevier**: 3th, p. 222-228, 2013.

PTACEK, L. J. *et al.*, Analysis in a large hyperkalemic periodic paralysis pedigree supports tight linkage to a sodium channel locus. **American journal of human genetics**, 49(2), 378-82. 1991.

PTACEK, L. J. *et al.*, Sodium channel mutations in acetazolamide-responsive myotonia congenita, paramyotonia congenita, and hyperkalemic periodic paralysis, **Neurology**, v. 44, n. 8, p. 1500, 1994.

QUITT, P.R. *et al.*, Myotonia congenita in a Labrador Retriever with truncated CLCN1. **Neuromuscular Disorders**, v. 28, n. 7, p. 597–605, 2018.

RAJA RAYAN, D.L. *et al.*, A new explanation for recessive myotonia congenita: Exon deletions and duplications in CLCN1. **Neurology**, v. 78, n. 24, p. 1953–1958, 2012.

REGATEIRO FJ. Manual de Genética Médica. 1ª ed., 2ª reimpressão. **Ed. Coimbra University Press**, 2007. <http://dx.doi.org/10.14195/978-989-26-0436-7>.

RICHARDSON, R.C. *et al.*, Truncating CLCN1 mutations in myotonia congenita: Variable patterns of inheritance. **Muscle and Nerve**, v. 49, n. 4, p. 593–600, 2014.

RICKER, K. *et al.*, Muscle stiffness and electrical activity in paramyotonia congenita. **Muscle Nerve**, 9: 299-305, 1986. doi: 10.1002 / mus.880090403

RHODES, T.H. *et al.*, A missense mutation in canine CIC-1 causes recessive myotonia congenita in the dog. **Departments of Medicine and Pharmacology, Vanderbilt University School of Medicine**, Nashville, TN 37232, USA. Department of Clinical Studies, University of Pennsylvania School of Veterinary Medicine, Philadelphia, PA 19104, USA. Received 3 June 1999; received in revised form 29 June 1999.

RUDEL, R.; LEHMANN-HORN, F. Membrane changes in cells from myotonia patients. **Physiological Reviews**, v. 65, n. 2, p. 310-356, 1985.

RUDOLPH, J.A. *et al.*, A sodium channel Phe to Leu mutation in periodic paralysis in Quarter horses: a common defect disseminated by selective breeding of a popular sire. **Nature Genetics**, 2: 144–147, 1992.

SASAKI, R. *et al.*, Compound heterozygous mutations in the muscle chloride channel gene (CLCN1) in a Japanese family with Thomsen's disease. **Clinical Neurology**, v. 53, n. 4, p. 316–319, 2013.

SAVIANE, C.; CONTI, F.; PUSCH, M, The Muscle Chloride Channel CIC-1 Has a Double-Barreled Appearance that Is Differentially Affected in Dominant and Recessive Myotonia, **The Journal of General Physiology**, v. 113, n. 3, p. 457, 1999.

SCHNEIDER-GOLD, C. *et al*, Guideline Myotonic Dystrophies, Non-Dystrophic Myotonias and Periodic Paralysis. **Aktuelle Neurologie**, v. 45, n. 3, p. 167–177, 2018.

SENER, U. *et al.*, Correlation of electromyography findings to muscle biopsy findings in patients with suspected myopathy. **Neurology**, v. 90, n. 15, 2018.

SHIRES, P.K.; NAFA, L.A.; HULSE, D.A. Myotonia in a Staffordshire terrier. **J Am Vet Med Assoc**. 183: 229–232, 1983.

SHORES, A. *et al.*, Myotonia congenita in a Chow Chow pup., **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 188, n. 5, p. 532–533, 1986.

SLOET, M. V. O. O. HYPP: hyperkalemic periodic paralysis in the horse. **Tijdschrift voor diergeneeskunde**, 124: 176–681, 1999.

STEINBERG, S.; BOTELHO, S., Myotonia in a horse. **Science (New York, N.Y.)**, v. 137, n. 3534, p. 979–980, 1962.

STEINMEYER, K. *et.al.*, Inactivation of muscle chloride channel by transposon insertion in myotonic mice. **Nature**, 354, pp. 304-308. 1991a

STEINMEYER, K.; ORTLAND, C.; JENTSCH, T.J. Primary structure and functional expression of a developmentally regulated skeletal muscle chloride channel. **Nature**, 354: 301–304. 1991b

STEINMEYER, K.*et al.*, Multimeric structure of ClC-1 chloride channel revealed by mutations in dominant myotonia congenita (Thomsen). Centre for Molecular Neurobiology (ZMNH), Hamburg University, Martinistrasse 52, D-20246 Hamburg, Germany and 'Medical Centre for Human Genetics, Marburg University, Bahnhofstrasse 7a, D-35037 Marburg, Germany. **The EMBO Journal** vol.13 no.4 pp.737-743, 1994.

STREIB, E. W. Paramyotonia congenita. In: **Seminars in neurology**. Thieme Medical Publishers, Inc., p. 249-257, 1991.

TANG, C.Y.; CHEN, T.Y. Physiology and pathophysiology of CLC-1: mechanisms of a chloride channel disease, myotonia. **BioMed Research International**. Dec 1; 2011.

THOMSEN, J., Tonische Krampfe in willkürlich beweglichen Muskeln in Folge von ererbter psychischer Disposition, **Archiv für Psychiatrie und Nervenkrankheiten**, v. 6, n. 3, p. 702-718, 1876.

TOLL, J.; COOPER, B.; ALTSCHUL, M., Congenital myotonia in 2 domestic cats. **Journal of veterinary internal medicine / American College of Veterinary Internal Medicine**, v. 12, n. 2, p. 116–119, 1998.

TRIP, J. *et al.*, Redefining the clinical phenotypes of non-dystrophic myotonic syndromes, **Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry**, v. 80, n. 6, p. 647, 2009.

TRIVEDI, Jr.; BUNDY, B.; STATLAND, J. *et al.* Non-dystrophic myotonia: prospective study of objective and patient reported outcomes. **Brain**. 136:2189-200, 2013.

TSUJINO, A.*et al.*, A CLCN1 mutation in dominant myotonia congenita impairs the increment of chloride conductance during repetitive depolarization. **Neuroscience Letters**, v. 494, n. 2, p. 155–160, 2011.

UNITED KENNEK CLUB - UKC. Disponível em: <https://www.ukcdogs.com/american-bulldog>. Acesso em 23 de agosto de 2019.

VICART, S.*et al.*, Human skeletal muscle sodium channelopathies. **Neurol Sci**. 26: 194 – 202, 2005.

VITE, C.H. *et al.*, Congenital myotonic myopathy in the miniature schnauzer: An autosomal recessive trait, **Journal of Heredity**, v. 90, n. 5, p. 578–580, 1999.

VITE, C.H. Myotonia and disorders of altered muscle cell membrane excitability. **Vet Clin North Am Small Anim Pract**. Jan;32(1):169-87, vii, 2002. Disponível em: <[https://doi.org/10.1016/S0195-5616\(03\)00084-6](https://doi.org/10.1016/S0195-5616(03)00084-6)>

WANG, Y.*et al.*, Mechanism of alternative splicing and its regulation. **Biomedical reports**, 3(2), 152–158, 2014. doi:10.3892/br.2014.407

WARD, A. J.; COOPER, T. A. The pathobiology of splicing. *J. Pathol.*, 220: 152-163, 2010. doi:10.1002/path.2649

WHITE, G. R.; PLASKETT, J. Nervous, Stif-legged, or Fainting Goats. **American Veterinary Review**, v. 28, p. 556–560, 1904.

WIJNBERG, I.D. *et al.*, A missense mutation in the skeletal muscle chloride channel 1 (CLCN1) as candidate causal mutation for congenital myotonia in a New Forest pony. **Neuromuscular Disorders**, v. 22, n. 4, p. 361–367, 2012.

YETKIN, M.F. *et al.*, A rare cause of hypotonia: Congenital myotonic dystrophy type 1. **Acta Myologica**, v. 37, n. 2, p. 178, p. 1. 2018.

ZHAI, J. *et al.*, Chapter 11 – Alternative Splicing and RNA Editing of Voltage-Gated Ion Channels: Implications in Health and Disease, *in*: PITT, Geoffrey S. **Ion Channels in Health and Disease**, Boston: Academic Press, p. 11, 2016.

ZHENG, S., High-Throughput Identification of Novel Alternative Splicing Regulators, Chapter Twelve - IRAS. *in*: FILONOV, Grigory S.; JAFFREY, Samie R. **Methods in Enzymology**, [s. l.]: Academic Press, v. 572, p. 269-289, 2016.