

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

**FREQUÊNCIA ALÉLICA DO POLIMORFISMO DE NUCLEOTÍDEO
ÚNICO c.421G>T NO GENE *ADAMTS2*, RESPONSÁVEL PELA
DERMATOSPARAXIA EM OVINOS WHITE DORPER**

DANILO GIORGI ABRANCHES DE ANDRADE

**Botucatu, SP
Fevereiro de 2017**

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

**FREQUÊNCIA ALÉLICA DO POLIMORFISMO DE NUCLEOTÍDEO
ÚNICO c.421G>T NO GENE *ADAMTS2*, RESPONSÁVEL PELA
DERMATOSPARAXIA EM OVINOS WHITE DORPER**

DANILO GIORGI ABRANCHES DE ANDRADE

Dissertação apresentada junto ao
Programa de Pós-graduação em
Medicina Veterinária para obtenção do
título de Mestre.

Orientador: Prof. Ass. Dr. José Paes de
Oliveira Filho

**Botucatu, SP
Fevereiro de 2017**

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

Andrade, Danilo Giorgi Abranches de.

Frequência alélica do polimorfismo de nucleotídeo único c.421G>T no gene *ADAMTS2*, responsável pela dermatosparaxia em ovinos White Dorper / Danilo Giorgi Abranches de Andrade.
- Botucatu, 2017

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

Orientador: José Paes de Oliveira Filho

Capes: 50501062

1. Ovino. 2. Dermatopatias genéticas. 3. Frequência do gene. 4. Colagenose. 5. Reação em cadeia da polimerase. 6. Técnicas de genotipagem. 7. Sequenciamento de nucleotídeo. 8. Polimorfismo (Genética).

Palavras-chave: Análise de sequência de DNA; Dermatopatias genéticas; Doenças do colágeno; Reação em cadeia da polimerase; Técnicas de genotipagem.

Nome do autor: Danilo Giorgi Abranches de Andrade

Título: FREQUÊNCIA ALÉLICA DO POLIMORFISMO DE NUCLEOTÍDEO ÚNICO c.421G>T NO GENE *ADAMTS2*, RESPONSÁVEL PELA DERMATOSPRAXIA EM OVINOS WHITE DORPER

COMISSÃO EXAMINADORA

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

Prof. Dr. Luiz Claudio Nogueira Mendes
Membro
Departamento de Clínica, Cirurgia e Reprodução Animal
FMVA - UNESP - Araçatuba, SP

Prof. Dr. Diego José Zanzarini Delfiol
Membro
Faculdade de Medicina Veterinária
FAMEV - UFU - Uberlândia, MG

Data da Defesa: 09 de fevereiro de 2017.

Agradecimentos

Aos familiares, principalmente meu pai Paulo Virgilio Abranches de Andrade e minha mãe Claudia Artigas Giorgi Abranches de Andrade pela paciência e apoio durante o período da pós-graduação.

Ao professor e orientador José Paes de Oliveira Filho pela oportunidade de execução desse trabalho e, sobretudo, pela amizade, confiança e apoio durante nossa convivência no período de residência e de mestrado.

Ao professor Alexandre Secorun Borges pela ajuda na idealização desse projeto, pelos seus ensinamentos desde meu segundo ano de graduação e por ser um exemplo de clínico a ser seguido.

Aos professores Diego José Zanzarini Delfiol, João Pessoa Araújo Júnior, Luiz Claudio Nogueira Mendes e Paulo Henrique Jorge da Cunha que aceitaram o convite para compor a banca examinadora.

À minha namorada Natache Arouca Garofalo pelo amor, carinho e paciência durante nosso convívio diário, tornando tudo mais fácil.

Aos professores do Departamento de Clínica Veterinária – FMVZ – Unesp – Botucatu Roberto Calderon Gonçalves, Rogério Martins Amorim e Simone Biagio Chiacchio pelas orientações, ensinamentos e exemplos de conduta durante os períodos da graduação e residência. Em especial ao professor Roberto Calderon Gonçalves por ter sido meu orientador durante os dois anos de residência, período em que mais cresci como médico veterinário.

Ao professor João Pessoa Araújo Júnior por disponibilizar o Laboratório de Diagnóstico Molecular para realização de importante fase desse trabalho.

Aos amigos pós-graduandos Anelize de Souza Trecenti, Campo Amor Vieira da Cunha Neto, César Erineudo Tavares de Araújo e Giovane Olivo pela amizade e pelo apoio técnico e intelectual durante a realização deste estudo. Aos amigos Didier Quevedo Cagnini e Peres Ramos Badial por fomentar meu interesse em pesquisa.

Aos amigos de república Felipe Morales Dalanezi, Leonardo Oliveira de Castro Prado, Pedro Negri Bernardino, Roberto Alexandre Yamawaki, Thiago Hideki Yamauti dos Santos e todos os outros moradores que vieram depois, por serem reais companheiros durante bons e maus momentos, mas mesmo que tivessem sido maus, sempre foram alegres com a companhia de vocês.

Especialmente ao amigo Felipe Morales Dalanezi pela disposição em sempre ajudar na realização do projeto.

Aos residentes e ex-residentes da Clínica de Grandes Animais, pelos ensinamentos, amizade e ajuda para que o projeto começasse, principalmente à Ana Claudia Gorino pelo cuidado inicial dos animais clinicamente afetados utilizados no estudo.

Aos funcionários da Clínica de Grandes Animais César Leme da Silva e Marco Antônio Simão da Silva pelo convívio prazeroso e ajuda sempre que necessário.

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

A todos os médicos veterinários, proprietários e funcionários das propriedades rurais visitadas, onde as amostras foram coletadas. Sem a colaboração dessas pessoas o trabalho não seria possível.

À Associação Brasileira de Criadores de Ovinos (ARCO), pelos dados gentilmente fornecidos.

Aos profissionais do curso de pós-graduação da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – Unesp - Botucatu, pelo auxílio prestado durante o curso de mestrado.

À Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - Unesp - Botucatu, pelo apoio desta instituição para o desenvolvimento desta dissertação.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo suporte financeiro.

Aos animais.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Rebanho ovino por país.	5
Tabela 2 – Maiores produtores de carne ovina.	6
Tabela 3 – Maiores importadores de carne ovina.	7
Tabela 4 – Maiores exportadores de carne ovina.	7
Tabela 5 - Plantel de ovinos White Dorper, com data de nascimento anterior a 31/12/2014, registrados na Associação Brasileira de Criadores de Ovinos (ARCO) e divididos nos diferentes estados brasileiros.	10
Tabela 6 - <i>Primers</i> utilizados no estudo.	23
Tabela 7 – Número de propriedades rurais visitadas e de animais amostrados de acordo com as mesorregiões do estado de São Paulo.	24
Tabela 8 - Perfil das propriedades rurais visitadas quanto à presença de animais <i>Wild Type</i> , heterozigotos, afetados no passado e se a etiologia da dermatosparaxia era conhecida.	25

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Efetivo do rebanho ovino brasileiro e por regiões. Na área do gráfico estão mostrados os valores do rebanho nacional e das cinco regiões brasileiras, nos anos de 1974 e 2014..... 8
- Figura 2 - Lesões cutâneas de um animal com dermatosparaxia. (A) Feridas lacerantes com presença de pele frouxa na região axilar e da articulação femorotibiopatelar direita. (B) Presença de extenso processo de reparação tecidual no membro pélvico direito. (C) Lesão lacerante na face plantar do membro pélvico esquerdo. (D) Ferida em base da orelha esquerda. Animal pertenceu ao estudo de Andrade et al. (2014). 16
- Figura 3 - Achados histopatológicos da dermatosparaxia. A) e D) Pele de animal normal. Notar quantidade normal de colágeno (seta). B) e E) Pele de animal afetado. Notar redução da quantidade de colágeno (seta) e presença de hemorragia (*). C) e F) Pele de animal afetado. Redução da quantidade de colágeno. (A-C) H&E; (D-F) Tricrômio de Masson; obj.5x. Fonte: Modificado de Andrade et al. (2014). 17
- Figura 4 – Eletroferogramas de três ovinos White Dorper (A: *Wild Type*; B: heterozigoto; C: homozigoto recessivo). O animal homozigoto recessivo pertenceu ao estudo de Andrade et al. (2014). 26

SUMÁRIO

	Página
RESUMO	1
ABSTRACT	2
1. INTRODUÇÃO	3
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	5
2.1 Panorama da ovinocultura brasileira	5
2.2 Importância das doenças genéticas	11
2.3 Dermatosparaxia	13
3. OBJETIVOS.....	20
3.1 Objetivo geral	20
3.2 Objetivos específicos	20
4. MATERIAL E MÉTODOS	21
4.1 Seleção dos animais	21
4.2 Coleta das amostras	21
4.3 Extração de DNA.....	22
4.4 Reação em cadeia da polimerase	22
4.5 Purificação dos produtos de PCR e sequenciamento	23
4.6 Análise estatística	23
5. RESULTADOS.....	24
6. DISCUSSÃO	27
7. CONCLUSÃO	30
8. BIBLIOGRAFIA.....	31
9. TRABALHOS CIENTÍFICOS.....	39
Anexo 1.....	66

ANDRADE, D. G. A. **Frequência alélica do polimorfismo de nucleotídeo único c.421G>T no gene *ADAMTS2*, responsável pela dermatosparaxia em ovinos White Dorper.** Botucatu – SP, 2016. 65p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu.

RESUMO

Dermatosparaxia é uma enfermidade autossômica recessiva do tecido conjuntivo caracterizada clinicamente por fragilidade e hiperextensibilidade cutâneas. Estas características impedem que o animal seja mantido no sistema de criação, sendo descartado na maioria dos casos. Descrita em diversas espécies, a dermatosparaxia foi relatada também em algumas raças de ovinos. O polimorfismo de nucleotídeo único (SNP) c.421G>T no gene *ADAMTS2* (a *disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin type I motif, 2*), em homozigose, é responsável pela enfermidade em ovinos da raça White Dorper. Recentemente a doença foi descrita no Brasil, contudo acredita-se que possa ter sido subdiagnosticada, uma vez que a enfermidade já foi descrita em diversos países. O objetivo desta pesquisa foi estimar a frequência alélica do SNP c.421G>T no gene *ADAMTS2* em ovinos da raça White Dorper do estado de São Paulo a partir de uma metodologia diagnóstica que utilizasse a reação em cadeia da polimerase (PCR) seguida do sequenciamento direto da região desse SNP. Neste estudo, foram coletadas amostras de sangue para extração do DNA de 303 ovinos da raça White Dorper. Após a extração do DNA, realizou-se PCR para amplificar a região do SNP e, então, o sequenciamento genético para determinar sua presença no gene *ADAMTS2*. A frequência alélica do SNP na população estudada foi de 7,8%. Este resultado indica que as medidas de controle devem ser adotadas para prevenir a propagação do SNP c.421G>T no gene *ADAMTS2* nos rebanhos de ovinos White Dorper brasileiros.

Palavras chave: análise de sequência de DNA; dermatopatias genéticas; doenças do colágeno; reação em cadeia da polimerase; técnicas de genotipagem.

ANDRADE, D. G. A. **Allelic frequency of single nucleotide polymorphism c.421G>T in the *ADAMTS2* gene, responsible for dermatosparaxis in White Dorper sheep.** Botucatu – SP, 2016. 65p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu.

ABSTRACT

Dermatosparaxis is an autosomal recessive disorder of the connective tissue; the disorder is clinically characterized by skin fragility and hyperextensibility. These skin defects prevent affected animals from entering the breeding system because they are either discarded or removed from their usual activities. Described in several species, dermatosparaxis has also been reported in some sheep breeds. The single nucleotide polymorphism (SNP) c.421G>T in the *ADAMTS2* (a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin type I motif, 2) gene, in homozygosity, is responsible for the disease in White Dorper sheep. Recently the disorder was described in Brazil, however, it might have been underdiagnosed since the disease has already been described in many countries. The aim of this study was to estimate the allelic frequency of SNP c.421G>T in the *ADAMTS2* gene in the White Dorper herd of Sao Paulo state, Brazil using a diagnostic methodology with polymerase chain reaction (PCR) and then direct sequencing of the SNP region. In this study, we collected blood DNA samples from 303 White Dorper sheep and performed PCR to amplify the SNP region. The samples were sequenced to determine the presence of the SNP in the *ADAMTS2* gene. The allelic frequency of the SNP in the studied population was 7.8%; this finding indicates that control measures should be adopted to prevent the inheritance of SNP c.421G>T in the *ADAMTS2* gene in Brazilian White Dorper herds.

Keywords: collagen diseases; genotyping techniques; polymerase chain reaction; sequence analysis, DNA; skin diseases, genetic.

1. Introdução

A dermatosparaxia é uma enfermidade de caráter genético que apresenta herança autossômica recessiva. Em animais, é também chamada de astenia cutânea ou *cutis* hiperelástica. Afeta o tecido conjuntivo e é caracterizada principalmente pela extrema fragilidade e hiperextensibilidade da pele (SCOTT, 2007).

Denominada em humanos como síndrome de Ehlers-Danlos (EDS) tipo VIIC (COLIGE et al., 1999), a dermatosparaxia já foi descrita em gatos (COUNTS et al., 1980), coelhos (SINKE et al., 1997), cães (PACIELLO et al., 2003), cavalos (WHITE et al., 2004), bovinos (KAWAGUCHI et al., 1988), búfalos (LAU, 1997) e em algumas raças de ovinos, como Norwegian (FJØLSTAD & HELLE, 1974), Finnsheep (ATROSHI et al., 1983), Merino (RAMSHAW et al., 1983), Texel (VAN WEEREN-KEVERLING BUISMAN & KOEMAN, 1986), Akkaraman (YILMAZ et al., 1998), Manchega (SUCUPIRA et al., 2009) e, predominantemente, White Dorper (VAN HALDEREN & GREEN, 1988; VAATSTRA et al., 2011; ZHOU et al., 2012).

Especialmente na raça White Dorper, a dermatosparaxia já foi relatada na África do Sul (VAN HALDEREN & GREEN, 1988), Austrália (AGGS, 2007), Nova Zelândia (VAATSTRA et al., 2011; ZHOU et al., 2012) e nos Estados Unidos (GRANT & PATTON, 2012). Recentemente a enfermidade foi descrita pela primeira vez no Brasil, em um ovino White Dorper proveniente de uma propriedade rural localizada no estado de São Paulo (ANDRADE et al., 2014). Posteriormente, foram encontrados animais heterozigotos para a enfermidade no nordeste brasileiro (CUNHA et al., 2014) e ovinos White Dorper clinicamente afetados em Minas Gerais (SILVA et al., 2015).

Assim como ocorre em humanos e em bovinos (COLIGE et al., 1999; COLIGE et al., 2004) a dermatosparaxia, em ovinos White Dorper, é ocasionada por alterações no gene *ADAMTS2* (*a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin type I motif, 2*). A substituição de uma guanina por uma timina no nucleotídeo 421 da sequência codificante (c.421G>T), no éxon 2, do gene *ADAMTS2* leva à doença nos ovinos dessa raça. Este polimorfismo de nucleotídeo único (SNP) (c.421G>T), quando em homozigose, é responsável pela formação de um códon finalizador prematuro, o qual leva à produção da enzima, confeccionada pelo gene *ADAMTS2*, truncada. Esse fato acarreta no

processamento inadequado do pró-colágeno em colágeno (ZHOU et al., 2012). Consequentemente, os animais com este SNP, nos dois alelos, manifestam sinais clínicos da dermatosparaxia. Além dessa etiologia, outro SNP (g.1862883G>A) também foi considerado causador da enfermidade, com herança autossômica recessiva (MONTEAGUDO et al., 2015). Este SNP foi capaz de substituir uma molécula de valina por uma de metionina, levando à alteração da estrutura da enzima ADAMTS-2 e, consequentemente, ao seu mal funcionamento (MONTEAGUDO et al., 2015).

O Brasil apresenta, aproximadamente, 18 milhões de ovinos (IBGE, 2014) e a partir dos anos 2000, a ovinocultura ganhou destaque no agronegócio brasileiro como uma nova alternativa para os produtores rurais diversificarem sua produção (RAINERI et al., 2014). Nesse período, as raças Dorper e White Dorper começaram a ser criadas em solo brasileiro por meio da importação de animais e logo ganharam destaque. Além disso, a raça White Dorper tem outras excelentes aptidões, como: boa habilidade materna; precocidade sexual; alta prolificidade; elevada fertilidade; rápido crescimento; excelentes características da carcaça e da carne e grande aceitabilidade da pele pela indústria (ROSANOVA et al., 2005). Entretanto, algumas linhagens de animais importados da África do Sul e da Austrália introduziram o alelo com o SNP causador da doença no Brasil (GOUVEIA et al., 2016).

Devido às feridas constantes e extensas ocasionadas pela fragilidade cutânea que podem levar a infecções, sepse e morte dos cordeiros (FJØLSTAD & HELLE, 1974), os animais clinicamente afetados são impedidos de se manter no sistema de criação comercial e, portanto, são descartados ou retirados de suas atividades habituais.

2. Revisão da literatura

2.1 Panorama da ovinocultura brasileira

A adaptação dos ovinos para diferentes climas, relevos e vegetações faz com que a ovinocultura possua ampla difusão mundial, estando presente em praticamente todos os continentes. Além disso, está destinada tanto à exploração econômica como à subsistência (VIANA, 2008). Segundo dados da *Food and Agriculture Organization* (FAO), a China se destaca como o país com maior número de animais, seguida de Austrália e Índia (Tabela 1). O rebanho mundial produz anualmente cerca de 9,8 milhões de toneladas de pele/lã, 10,4 milhões de toneladas de leite e 8,9 milhões de toneladas de carne (FAO, 2013; 2014).

TABELA 1 – Rebanho ovino por país.

Ranking	País	Rebanho ovino (número de animais)
-	Mundo	1.195.624.523
1º	China	194.927.000
2º	Austrália	72.612.000
3º	Índia	63.000.000
4º	Irã	45.000.000
5º	Nigéria	41.326.780
6º	Sudão	39.846.000
7º	Reino Unido	33.743.000
8º	Turquia	31.140.244
9º	Nova Zelândia	29.803.402
10º	Etiópia	29.332.382
18º	Brasil	17.614.454

Fonte: FAOSTAT (2014)

O mercado da lã ainda pode ser rentável em países que a produzem com qualidade superior, como na Austrália. A produção de lã australiana tem destaque no cenário internacional devido à utilização de tecnologia avançada em seus sistemas de produção (VIANA, 2008). Esse país foi o maior exportador

mundial de lã ovina em 2013 com 120 mil toneladas (FAO, 2013). No que diz respeito ao leite, o continente europeu destaca-se com a produção de 29,5% do total mundial em 2014 (FAO, 2014), basicamente destinados à indústria de queijos finos (VIANA, 2008).

Entretanto, atualmente, o principal intuito da ovinocultura é a produção de carne. Esse produto, por exemplo, tem elevada aceitação nos mercados da União Europeia e dos Estados Unidos da América por ser visto como um produto diferenciado. Os valores nestes países chegam a US\$5.278/ton e US\$2.331/ton, respectivamente (PILAN, 2013).

Entre os principais países produtores de carne ovina, destacam-se China, Austrália e Nova Zelândia (Tabela 2). Apesar de ser o maior produtor, a China também é o maior importador de carne ovina (Tabela 3), enquanto que Austrália e Nova Zelândia se destacam nas exportações desse produto (Tabela 4).

TABELA 2 – Maiores produtores de carne ovina.

Ranking	País	Toneladas
1º	China	2.184.000
2º	Austrália	720.600
3º	Nova Zelândia	487.143
4º	Turquia	312.527
5º	Reino Unido	298.000
26º	Brasil	85.903

Fonte: FAOSTAT (2014)

O Brasil possui cerca de 17,6 milhões de ovinos, entretanto concentrados nos estados das regiões Nordeste e Sul (Figura 1). Na região Nordeste, os ovinos são principalmente de raças deslanadas, adaptados ao clima tropical e criados com o intuito de produzir carne e pele, entretanto, em sua maioria como pecuária de subsistência (VIANA, 2008).

TABELA 3 – Maiores importadores de carne ovina.

Ranking	País	Toneladas
1º	China	254.335
2º	França	102.696
3º	Reino Unido	98.293
4º	Estados Unidos	69.446
5º	Arábia Saudita	45.129

Fonte: FAOSTAT (2014)

TABELA 4 – Maiores exportadores de carne ovina.

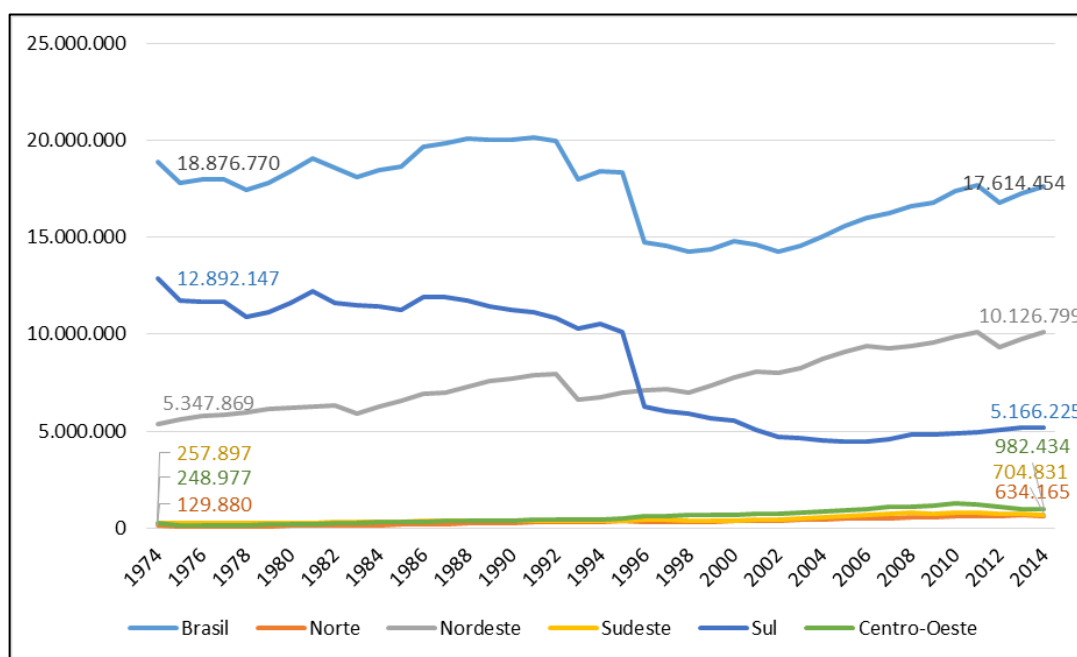
Ranking	País	Toneladas
1º	Austrália	413.278
2º	Nova Zelândia	397.507
3º	Reino Unido	103.157
4º	Irlanda	42.595
5º	Espanha	33.108

Fonte: FAOSTAT (2014)

Já na região Sul, principalmente no estado do Rio Grande do Sul, os ovinos eram criados, desde o início do século XX, com o objetivo principal de produzir lã. Nesse sentido, as principais raças criadas eram Merino Australiano, Ideal e Corriedale, esta última de dupla aptidão (carne e lã), porém a carne ovina era considerada um produto secundário, muitas vezes consumida apenas nos estabelecimentos rurais (ÁVILA et al., 2013). No final da década de 1980, iniciou-se uma crise na ovinocultura gaúcha devido à crise internacional da lã, cujos motivos foram (1) o grande estoque de lã da Austrália, que criou mecanismos de proteção comercial e deslocou os consumidores para confecções de algodão e fibras sintéticas; (2) o avanço tecnológico do setor têxtil, que fez com que fibras sintéticas ganhassem espaço no mercado com preços altamente competitivos e (3) a diminuição da demanda internacional da lã, já que episódios de colapsos e crises internacionais estavam presentes nesse período em diversos países e

regiões, como: URSS, Europa Ocidental, Japão, China e Ásia. Portanto, grande parte dos criadores migraram para outras atividades agropecuárias e, com isso, o rebanho brasileiro diminuiu significativamente no início da década de 1990 (Figura 1), enquanto outros reestruturaram seus rebanhos para trabalhar com raças de dupla aptidão ou produção somente de carne com a criação de animais das raças Hampshire Down, Suffolk, Ile de France e Texel (ÁVILA et al., 2013).

FIGURA 1 - Efetivo do rebanho ovino brasileiro e por regiões. Na área do gráfico estão mostrados os valores do rebanho nacional e das cinco regiões brasileiras, nos anos de 1974 e 2014.



Fonte: IBGE - Pesquisa Pecuária Municipal

Já no início dos anos 2000, a ovinocultura passou a ser considerada como uma nova alternativa para a diversificação do agronegócio brasileiro e atraiu investidores motivados pelo deficit entre a produção e a demanda de carne de cordeiro no país (RAINERI et al., 2014). No entanto, o consumo per capita de desse produto no Brasil gira em torno de 0,7 kg por ano (FAO, 2003), o que é muito inferior a outros países, como a Nova Zelândia, que apresenta um consumo per capita anual de 42,2 kg (ÁVILA et al., 2013). O baixo consumo de carne ovina no Brasil se deve: à falta de hábito do consumidor, à irregularidade da oferta, à má qualidade do produto à venda e à má apresentação comercial do produto oferecido no mercado interno. Além disso, estima-se que no mínimo 90%

da carne ovina consumida no país seja de origem clandestina (ÁVILA et al., 2013).

Entretanto, a região Sudeste pode ganhar destaque na ovinocultura de corte, já que apresentou perante às outras regiões do Brasil, entre os anos 2000 e 2012, a maior taxa de crescimento do rebanho ovino (86,14%) (RAINERI et al., 2014). Particularmente, o estado de São Paulo apresenta grande potencial para a criação de ovinos, pois suas propriedades rurais estão reduzindo de tamanho devido ao processo sucessório das famílias e da cadeia produtiva da cana-de-açúcar (SOUZA et al., 2008) e ainda apresenta proximidade com os grandes centros de consumo (DECKER et al., 2016).

Além disso, o crescimento da produção paulista de ovinos é um produto da melhora genética e da implantação de Núcleos Regionais, formados por grupos de criadores organizados que unem esforços para o desenvolvimento regional. Isso permite compras conjuntas de insumos, melhora da estrutura da produção e comercialização da carne ovina assim como possibilita a padronização, qualidade e escala de abate (STAUDT & SILVA, 2008). Já o melhoramento genético foi obtido pela adesão a programas de seleção de algumas raças, como a Santa Inês (STAUDT & SILVA, 2008), e importação de animais de raças especializadas na produção de carne, como Dorper e White Dorper, da África do Sul e Austrália, no início dos anos 2000 (ROSANOVA et al., 2005). Tais animais, originários da África do Sul, difundiram-se rapidamente pelos territórios paulista e brasileiro, pois são dotados de qualidades que aliam eficiência produtiva às exigências atuais da ovinocultura: alta adaptabilidade a diferentes sistemas de criação; boa habilidade materna; elevada fertilidade e altas taxas de crescimento e musculabilidade, gerando carcaças de qualidade (ROSANOVA et al., 2005). Na Tabela 5, há o número dos ovinos registrados da raça White Dorper presentes nos diversos estados do Brasil no ano de 2014. Foram desconsiderados os animais puros de origem destinados ao abate e/ou sem registro.

TABELA 5 - Plantel de ovinos White Dorper, com data de nascimento anterior a 31/12/2014, registrados na Associação Brasileira de Criadores de Ovinos (ARCO) e divididos nos diferentes estados brasileiros.

Estado	Número de animais
São Paulo	9.772
Paraná	947
Bahia	484
Pernambuco	474
Goiás	424
Minas Gerais	271
Espírito Santo	215
Sergipe	203
Distrito Federal	162
Mato Grosso	125
Mato Grosso do Sul	111
Rio de Janeiro	86
Rio Grande do Sul	80
Paraíba	67
Piauí	51
Ceará	39
Rio Grande do Norte	34
Alagoas	31
Santa Catarina	11
Amazonas	9
Pará	2
Total	13.598

Fonte: Relatório de número de animais por cidade - Associação Brasileira de Criadores de Ovinos (ARCO) – 2015.

Portanto, a ovinocultura brasileira está em expansão, porém ainda há muito o que evoluir. O aumento do consumo de carne ovina é o principal desafio para acelerar o crescimento do setor. Para isso, deve-se atentar para estratégias de marketing que a apresentem como sendo um produto seguro e de qualidade, além de ações industriais para fidelizar o consumidor, como a disponibilização de ampla variedade de cortes (VIANA, 2008). Ainda, aspectos de gestão nas propriedades rurais precisam ser melhor aproveitados com o intuito de aumentar o retorno financeiro do negócio (DECKER et al., 2016), porém sempre respeitando o bem-estar das pessoas e dos animais para que as necessidades

do mercado consumidor sejam atendidas e as barreiras da produção de carne com qualidade apreciável sejam ultrapassadas (MARTINS et al., 2014).

2.2 Importância das doenças genéticas

Doenças genéticas em humanos são comumente causadas por mutações múltiplas, que ocasionam variações tanto na idade de apresentação quanto na evolução clínica. Além disso, também podem interferir no diagnóstico com base em ensaios enzimáticos. Esta heterogeneidade não é amplamente relatada em medicina veterinária, na qual uma única mutação é esperada para a maioria das doenças genéticas. Isso ocorre porque, em geral, as raças se desenvolveram em áreas geográficas localizadas, a partir de um número pequeno de animais fundadores e foram desenvolvidas por meio de programas de melhoramento controlados e baseados no registro genealógico. Devido a esses fatos, há uma menor diversidade genética do que na maioria das populações humanas (JOLLY, 2002). Em contraste, a incidência de uma determinada doença hereditária pode ser maior do que na maioria das populações humanas, já que há um maior grau de parentesco entre animais da mesma raça (JOLLY et al., 2004). Portanto, altos níveis de endogamia (*inbreeding*) estão associados à diminuição da variabilidade genética na população e ao aumento do aparecimento de enfermidades genéticas (TEMPLETON, 2006).

As variações genéticas, por meio de seus efeitos sobre a expressão do gene e função da proteína traduzida, constituem as bases das doenças genéticas em animais de produção. Essas variações estão na forma de polimorfismos de nucleotídeos únicos; deleções ou inserções de nucleotídeos ou genes inteiros; ou rearranjos do cromossomo. Nos indivíduos afetados, elas exercem diferentes graus de efeito sobre a ação do gene, tais como: substituição de um aminoácido por outro; interrupção prematura da tradução pela formação de um códon finalizador prematuro e eliminação de todo o éxon ou gene. Esses fatores influenciam a função do gene alterando/eliminando a função da proteína ou afetando o padrão de *splicing* do RNA mensageiro (IBEAGHA-AWEMU et al., 2008; LÜHKEN, 2012).

Algumas condições alertam para a possibilidade de uma doença apresentar caráter genético e hereditário: prevalência maior em um grupo de animais com elevado parentesco; aumento gradual no número de casos em um período de

tempo ou aparecimento súbito da doença após introdução de um novo reprodutor e distribuição uniforme ao longo do ano e em diferentes localizações geográficas. Além disso, a repetição de acasalamentos de um grupo produz os mesmos resultados em uma mesma proporção numérica (RADOSTITIS et al., 2002; GENTILI & TESTONI, 2006). Entretanto, a maioria das enfermidades genéticas nos animais domésticos e, sobretudo na espécie ovina, tende a apresentar herança autossômica recessiva, pois os genes mutantes dominantes em homozigose possuem propensão a letalidade, ou podem ainda ser debilitantes, quando em indivíduos heterozigotos (BASRUR & YADAV, 1990).

Apesar de os criadores se esforçarem para perpetuar somente as características desejáveis dos animais de seus rebanhos, a prática de seleção involuntariamente pode levar à ocorrência de características indesejáveis, como as enfermidades de origem genética (BASRUR & YADAV, 1990). Animais de raça pura são mais comumente acometidos pelas doenças hereditárias, já que possuem uma base genética mais padronizada que animais mestiços, porém nestes, as enfermidades também podem ocorrer, entretanto com menor frequência (RADOSTITIS et al., 2002).

Embora distúrbios semelhantes possam ser observados em diferentes raças de ovinos, o seu modo de transmissão pode não ser o mesmo nessas raças. Isso acontece porque a capacidade de um gene mutante criar uma doença em um indivíduo depende do meio genético fornecido pelos outros genes expressados pelo animal. Esse fato explica também o porquê de algumas doenças genéticas apresentarem diferentes graus de gravidade em diferentes raças. Outro fator que leva à variação na gravidade de uma doença genética em diferentes raças é que uma doença clinicamente semelhante pode ser ativada por genes mutantes diferentes (BASRUR & YADAV, 1990).

Uma característica importante que dificulta o controle de doenças de caráter autossômico recessivo é o fato de que quando a mutação é finalmente caracterizada, o número de alelos recessivos distribuídos na população já deve ter atingido proporções elevadas. Comumente, muitos anos se passam entre a ocorrência de uma mutação e o aparecimento da doença (GENTILI & TESTONI, 2006). Portanto, a detecção dos animais heterozigotos (carreadores da mutação e clinicamente normais), que pode ser feito por análise da progênie, ensaios enzimáticos ou por técnicas moleculares, é de fundamental importância para o

controle dessas enfermidades (RADOSTITIS et al., 2002). Entretanto, a implementação de programas de controle de doenças genéticas em animais depende de investimentos em pesquisa e de elevados graus de confiança e cooperação entre criadores, pesquisadores, instituições e associações das raças envolvidas. Esses últimos órgãos têm papel fundamental, já que possuem capacidade para controlar registros de pedigree e, portanto, propiciam a realização de um melhor controle nos acasalamentos (JOLLY, 2002).

A adoção de medidas de controle para identificar indivíduos heterozigotos deve ser melhor aproveitada para efetivamente identificar e controlar geneticamente a dermatosparaxia. Enquanto as sequências do genoma de ovinos e caprinos ainda eram desconhecidas, frequentemente era necessário o uso de dados de outras espécies, preferencialmente dos bovinos, para desenho de *primers*, PCR e sequenciamento genético, ou seja, a maioria das mutações em ovinos foi identificada por abordagens de genes candidatos. Essa abordagem ainda tem sido utilizada, porém os estudos genéticos podem ser facilitados por estudos de associação genômica ampla (GWAS) e espera-se que mais SNPs causadores de enfermidades na espécie ovina sejam identificados com a utilização desta ferramenta (LÜHKEN, 2012).

Por fim, o controle genético das doenças dos animais pode reduzir os custos associados com doenças, melhorar o bem-estar animal e fornecer produtos animais saudáveis para os consumidores (IBEAGHA-AWEMU et al., 2008).

2.3 Dermatosparaxia

A dermatosparaxia é uma doença genética de caráter autossômico recessivo, que acomete o tecido conjuntivo e é caracterizada principalmente pela fragilidade extrema e hiperextensibilidade da pele (ZHOU et al., 2012). Esta enfermidade também é descrita em humanos como síndrome de Ehlers-Danlos (EDS) tipo VIIC (COLIGE et al., 1999).

A EDS, em humanos, compreende um grupo de doenças do tecido conjuntivo clinicamente e geneticamente heterogêneas em que as principais características clínicas são hiperextensibilidade da pele; feridas com retardamento da cicatrização e com cicatrizes atróficas; hipermobilidade articular; hematomas de fácil aparecimento e fragilidade generalizada do tecido

conjuntivo (STEINMAN et al., 2002). Estas manifestações clínicas estão presentes, em diferentes graus, em cada subtipo da condição. O tipo clássico, também conhecido como tipos I e II, segue padrão de herança autossômica dominante, tem prevalência estimada em 1:20.000 e apresenta-se clinicamente com pele hiperextensível; presença de amplas cicatrizes atróficas e hiper mobilidade das articulações. O tipo III exibe padrão de herança autossômica dominante e é caracterizado pela hiper mobilidade generalizada das articulações. Sua prevalência está entre 1:5.000 e 1:20.000. O tipo IV é chamado de vascular, pois caracteriza-se por rupturas vasculares ou viscerais espontâneas e presença de hematomas visíveis devido à pele delgada. Apresenta padrão de herança autossômica dominante e prevalência de 1:100.000. Os últimos quatro tipos (VI, VIIA, VIIB e VIIC) ainda não têm suas prevalências identificadas, mas são mais raros. Os tipos VI e VIIC apresentam padrão de herança autossômica recessivo e os tipos VIIA e VIIB, dominante. EDS tipo VI exibe hipotonia muscular grave desde o nascimento e fragilidade ocular. Os tipos VIIA e VIIB caracterizam-se por hiper mobilidade das articulações grave e generalizada com subluxações recorrentes (PAEPE & MALFAIT, 2004; CHRISTOPHERSEN & ADAMS, 2014).

A dermatosparaxia pode apresentar outros sinais clínicos além dos citados anteriormente. Em humanos pode-se encontrar esclera azul, micrognatia, hérnia umbilical e atraso no crescimento (PETTY et al., 1993). Nos cães já foi relatado flacidez das articulações; sinais clínicos oculares, como luxação do cristalino, catarata e edema de córnea (BARNETT & COTTRELL, 1987) e ruptura vascular espontânea (URI et al., 2015). Já nos gatos, hérnias perineais e diafragmáticas já foram descritas (BENITAH et al., 2004).

Entretanto, uma forma moderada da doença foi descrita na Austrália em ovinos da raça Merino. Estes apresentaram fragilidade cutânea, que foi observada apenas durante a tosquia, uma vez que os animais desenvolveram feridas decorrentes da manipulação e da contenção (RAMSHAW, 1984). Esses animais apresentavam apenas 25% da atividade da aminopropeptidase dos animais normais (RAMSHAW, 1984) e a avaliação microscópica das lesões de pele destes animais revelou que as fibrilas de colágeno eram irregulares e agrupadas de forma desordenada nos feixes de fibras de colágeno. Estes feixes, por sua vez, não eram compactos e entrelaçados e com tendência a formar

camadas em folhas na derme reticular, como deveriam (BAVINTON et al., 1985). Curiosamente, nessa forma da doença, os sinais clínicos de hiperextensibilidade da pele e hipermobilidade das articulações não estavam presentes (RAMSHAW, 1984). Além disso, essa forma moderada da doença não é observada primeiramente em cordeiros, mas sim nos animais adultos, em especial, durante situações de manejo, como a tosquia (BAVINTON et al., 1985).

Humanos portadores da síndrome de Ehlers-Danlos tipo VIIC e bovinos com dermatosparaxia apresentam mutações no gene *ADAMTS2* que têm como resultado a diminuição da atividade da enzima ADAMTS-2, que atua na maturação do colágeno (COLIGE et al., 2004). O SNP responsável pela dermatosparaxia em ovinos da raça White Dorper se assemelha às mutações encontradas em humanos e bovinos, já que a substituição de uma guanina por uma timina no nucleotídeo 421 da sequência codificante (c.421G>T), no éxon 2, do gene *ADAMTS2* provoca um códon finalizador prematuro e, consequentemente, produção de uma proteína ADAMTS-2 truncada, que contém apenas o peptídeo sinalizador e parte do pró-domínio (ZHOU et al., 2012). A produção desta proteína truncada e afuncional leva a um defeito no processamento da porção N-terminal do pró-colágeno tipo I (LAPIÈRE et al., 1971). Uma vez que a conversão do pró-colágeno em colágeno é fundamental para garantir a elasticidade adequada e força tênsil da pele (BECKER et al., 1976), animais com este SNP, em homozigose, apresentam os sinais clínicos clássicos da dermatosparaxia (Figura 2) em sua forma grave, ou seja, pele hiperextensível e extremamente frágil, sendo facilmente rompida ao menor trauma ou ao ser tracionada (VAATSTRA et al., 2011).

Os achados histopatológicos das lesões cutâneas condizentes com a forma clássica da dermatosparaxia são: derme apresentando colágeno displásico arranjado em feixes pequenos, fragmentados e com focos de degeneração e, devido à sua hipoplasia, os anexos cutâneos apresentam-se mais proeminentes, porém preservados e sem características atípicas, assim como a epiderme (Figura 3) (FJØLSTAD & HELLE, 1974; VAN HALDEREN & GREEN, 1988; VAATSTRA et al., 2011; ANDRADE et al., 2014). Além disso, Vaatstra et al. (2011) observaram elevação da pele acima das articulações devido ao edema gelatinoso e hemorragia discreta a moderada das bordas das feridas cutâneas. No entanto, não encontraram nenhuma anormalidade em musculatura,

ligamentos, articulações, esclera, dentes, ossos, sistema cardiovascular e trato gastrointestinal.

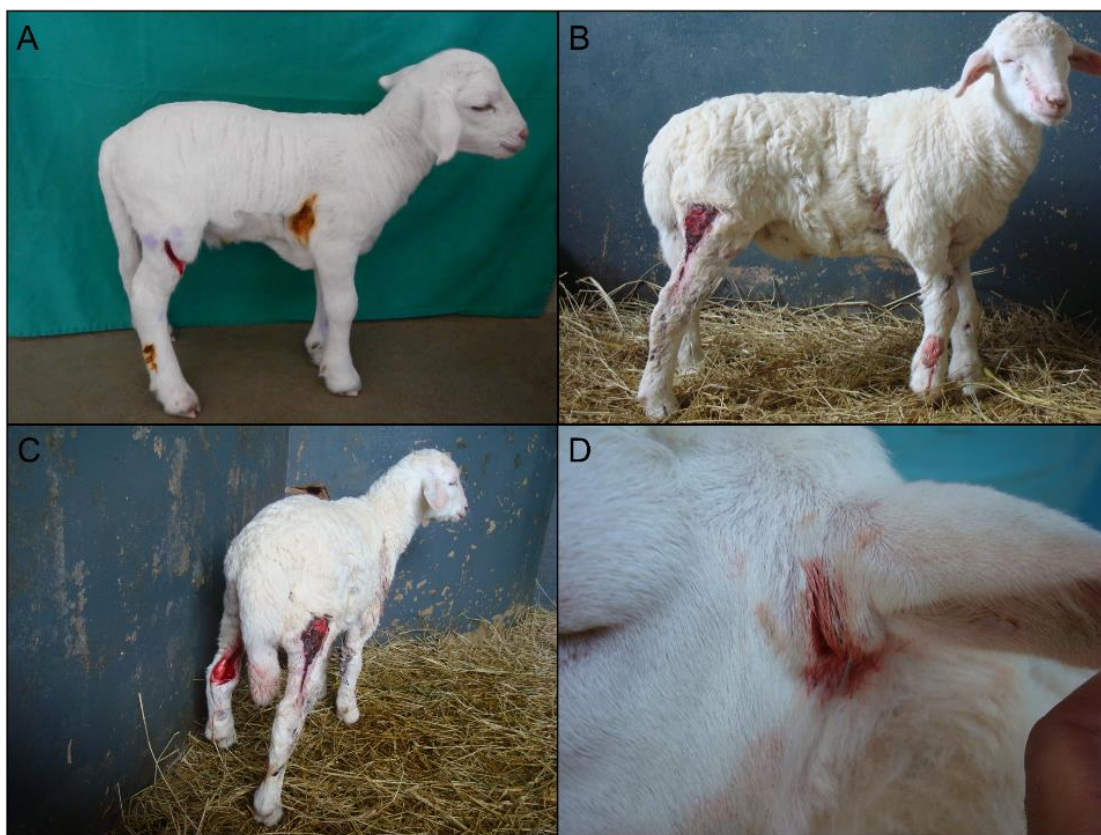


FIGURA 2 - Lesões cutâneas de um animal com dermatosparaxia. (A) Feridas lacerantes com presença de pele frouxa na região axilar e da articulação femorotibiopatelar direita. (B) Presença de extenso processo de reparação tecidual no membro pélvico direito. (C) Lesão lacerante na face plantar do membro pélvico esquerdo. (D) Ferida em base da orelha esquerda. Animal pertenceu ao estudo de Andrade et al. (2014).

Além das técnicas moleculares e da histopatologia, a confirmação do diagnóstico pode ser realizada por meio da microscopia eletrônica (VAATSTRA et al., 2011), em que são visualizados: fibrilas de colágeno irregularmente formadas e compostas de fitas torcidas, que não são envoltas em feixes apertados e ordenados (RAMSHAW, 1984; BAVINTON et al., 1985).

Visto que não há tratamento, diversos países, como África do Sul, Nova Zelândia e Austrália, adotam testes comerciais, que identificam o SNP c.421G>T no gene *ADAMTS2* como medida de controle para dermatosparaxia em ovinos da raça White Dorper (AGGS, 2007; KELLY, 2012; BELL, 2014; LINCOLN UNIVERSITY). Em substituição aos testes comerciais utilizados para diagnóstico, pode ser realizada PCR utilizando *primers* especificamente

desenhados para amplificar a região com o SNP e, em seguida, o sequenciamento direto dos produtos da PCR (ANDRADE et al., 2014). Tal metodologia mostrou-se eficiente e segura, bem como possibilitou o diagnóstico definitivo de dermatosparaxia.

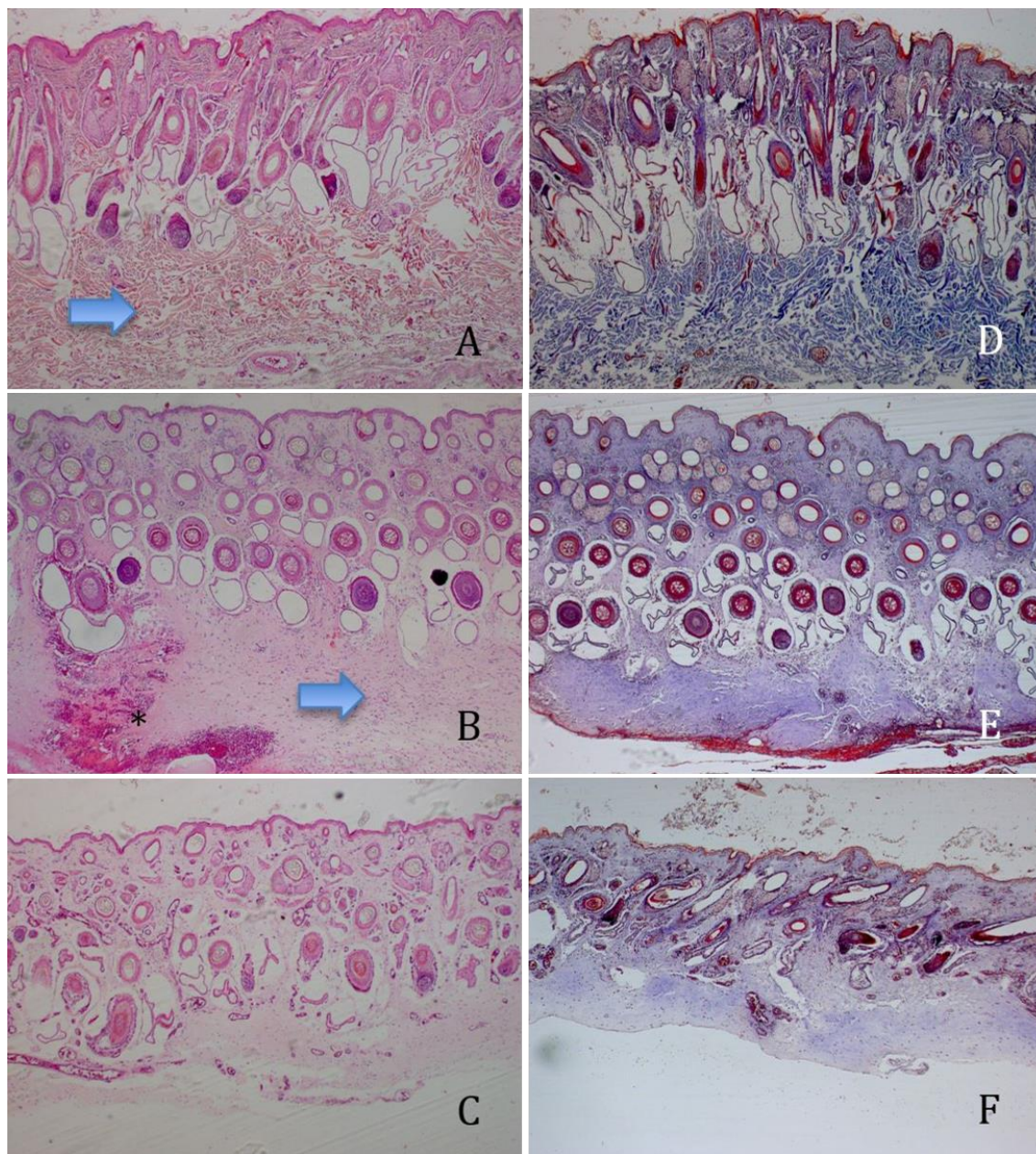


FIGURA 3 - Achados histopatológicos da dermatosparaxia. A) e D) Pele de animal normal. Notar quantidade normal de colágeno (seta). B) e E) Pele de animal afetado. Notar redução da quantidade de colágeno (seta) e presença de hemorragia (*). C) e F) Pele de animal afetado. Redução da quantidade de colágeno. (A-C) H&E; (D-F) Tricrômio de Masson; obj.5x. Fonte: Modificado de Andrade et al. (2014).

Recentemente, um SNP *missense*, ou seja, alteração de uma base que resulta na troca de um aminoácido por outro, foi identificado em homozigose no éxon 4 do gene *ADAMTS2*. Este SNP (g.1862883G>A) foi considerado causador da dermatosparaxia, também com herança autossômica recessiva, em um cordeiro de um rebanho de animais mestiços (MONTEAGUDO et al., 2015). Diferentemente do SNP descrito por Zhou et al. (2012), que produz um códon finalizador prematuro (*nonsense*), esse SNP foi capaz de substituir uma molécula de valina por uma de metionina, o que afetou o domínio catalítico da enzima ADAMTS-2 levando à alteração de sua estrutura e ao seu mal funcionamento (MONTEAGUDO et al., 2015).

Embora não provoque diretamente a morte do animal, a dermatosparaxia em sua forma grave é uma enfermidade considerada letal, uma vez que as feridas extensas presentes ao nascimento ou poucas horas após, se infeccionam facilmente podendo levar a um quadro de sepse e morte dos cordeiros (FJØLSTAD & HELLE, 1974). Na presença de casos de cordeiros com sinais clínicos de fragilidade cutânea, principalmente com algum grau de sangue White Dorper, e/ou em rebanhos com alta taxa de endogamia, a dermatosparaxia deve ser considerada como um diagnóstico diferencial. Devem ser diferenciadas, também, epidermólise bolhosa e osteogênese imperfeita (VAATSTRA et al., 2011).

A epidermólise bolhosa descreve um grupo de doenças cutâneas hereditárias que são caracterizadas clinicamente por bolhas na pele e em membranas mucosas após um trauma mínimo. Em ovinos, é considerada com padrão autossômico recessivo (JOLLY et al., 2004). Nessa doença, a ancoragem da epiderme na derme é interrompida por causa de defeitos de uma das proteínas que formam a zona de membrana basal (OSTMEIER et al., 2012). Os sinais clínicos são erosões na mucosa oral, particularmente na linha média do palato duro, língua e lábios; vesículas avermelhadas de até 5 mm de diâmetro, que evoluem para úlceras, nos bordos inferiores dos lábios; perda de pele e dermatite exsudativa em membros, na borda coronária e nos cascos. Na maioria dos casos, os cascos se soltam e deixam a derme exposta (JOLLY et al., 2004). Histologicamente, ocorre separação completa da epiderme e da derme, formando bolhas abaixo da membrana basal, preenchidas com conteúdo

proteico e eritrócitos (ALLEY et al., 1974; JOLLY et al., 2004; PÉREZ et al., 2011).

Já a osteogênese imperfeita compreende um grupo heterogêneo de doenças do tecido conjuntivo, considerado de caráter autossômico dominante e causado por mutações em genes que levam a defeitos na síntese do colágeno tipo I, que é o tipo predominante em ossos, dentina, tendões e esclera (JOLLY et al., 2004). Em ovinos, já foram descritos cordeiros que nasceram com fragilidade cutânea e com ossos frágeis, inclusive com fraturas nas costelas (ARTHUR et al., 1992). Além dessas alterações, os animais acometidos podem apresentar braquignatia, dentes pequenos, edema subcutâneo, flacidez das articulações e alteração na coloração da esclera. Microscopicamente, há uma deficiência acentuada de colágeno na derme de cordeiros afetados, enquanto nos ossos, as placas de crescimento são essencialmente normais, mas o trabeculado ósseo é fino e poroso, compostos de trabéculas ósseas irregulares e separadas por tecido fibroso (ARTHUR et al., 1992).

3. Objetivos

3.1 Objetivo geral

- Estimar a frequência alélica do SNP c.421G>T no gene *ADAMTS2*, responsável pela dermatosparaxia em ovinos White Dorper, no estado de São Paulo.

3.2 Objetivos específicos

- Aplicar a PCR seguida do sequenciamento gênico da região do SNP c.421G>T no gene *ADAMTS2* em amostras de DNA obtidas de sangue de ovinos White Dorper.
- Verificar o conhecimento da dermatosparaxia entre os proprietários e médicos veterinários responsáveis pelas propriedades rurais criadoras de ovinos White Dorper amostrados.

4. Material e métodos

Todos os procedimentos realizados foram previamente aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ), Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (Unesp), Campus de Botucatu, sob protocolo 39/2016.

4.1 Seleção dos animais

O tamanho da amostra foi calculado utilizando o software OpenEpi (versão online 3.01). Utilizou-se o número total de ovinos White Dorper registrados e presentes no estado de São Paulo, informação cedida gentilmente pela Associação Brasileira de Criadores de Ovinos (ARCO), cujo valor foi de 9.772 animais; aplicou-se uma margem de erro de 5% e um intervalo de confiança de 95%. Como não havia dados estimativos, na literatura nacional, da prevalência de animais heterozigotos para o alelo com o SNP c.421G>T no gene *ADAMTS2*, a prevalência antecipada desses ovinos foi utilizada baseada em um estudo da Nova Zelândia (ZHOU et al., 2012), cujo valor encontrado foi de 21,5%, o que gerou um tamanho de amostra de 253 animais. Já a frequência alélica do SNP foi calculada segundo Griffiths et al. (2016).

A seleção das propriedades rurais foi realizada utilizando a relação de criadores de ovinos White Dorper da Associação Paulista de Criadores de Ovinos (Aspaco) e eram de diferentes regiões do estado. Inicialmente os proprietários ou responsáveis foram contatados e informados dos objetivos do estudo e aqueles que consentiram a autorização para que amostras do seu rebanho fossem coletadas foram incluídos no estudo, após assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

4.2 Coleta das amostras

Durante as visitas para coleta das amostras, perguntas em relação a dermatosparaxia (conhecimento da enfermidade na espécie ovina, se houve ocorrência de casos compatíveis com a doença na propriedade rural e se já tinha sido observado doença similar em outra espécie animal) foram realizadas aos responsáveis.

Foram coletadas amostras sanguíneas por punção da veia jugular com agulha 21G (BD Vacutainer®) em tubos de 5 mL contendo EDTA (BD

Vacutainer®). As amostras foram imediatamente armazenadas sob refrigeração até o procedimento de extração de DNA. Todo o rebanho das propriedades rurais foi coletado, exceto nas com mais de 50 animais, onde deu-se preferência para os machos reprodutores e as fêmeas utilizadas nos acasalamentos.

4.3 Extração de DNA

A extração do DNA genômico das amostras sanguíneas foi realizada com o GenElute™ Blood Genomic DNA Kit (Sigma-Aldrich®), utilizando-se 200 µL de sangue total e seguindo os procedimentos do fabricante, exceto o volume da solução de eluição, que foi de 80 µL.

Ao final dos procedimentos de extração, o DNA purificado foi avaliado quanto à sua pureza (A260/280) e concentração por espectrofotometria no NanoDrop® 2000 Spectrophotometer (Thermo Scientific™). Para ser utilizada na pesquisa, a amostra devia apresentar relação A260/A280 entre 1,8 e 2,0 e concentração mínima de 20 ng/µl. Em seguida, o tubo contendo DNA purificado foi armazenado em caixas de papelão identificadas com o nome do projeto e congelado em freezer a -20°C até os procedimentos de PCR.

4.4 Reação em cadeia da polimerase

A PCR foi realizada com *primers* previamente descritos por Andrade et al. (2014) (Tabela 7) que amplificavam um fragmento de 231 pb em que estava contida a região do SNP c.421G>T no gene *ADAMTS2*. A reação foi padronizada com volume final de 40 µL, sendo 20 µL de GoTaq® Green Master Mix (Promega™); 1,6 µL (400 nM) de cada um dos *primers* (*forward* e *reverse*); 12,8 µL de água livre de nucleases e 4,0 µL da amostra de DNA purificado. As condições de termociclagem (Mastercycler® ep gradient S - Eppendorf®) foram: desnaturação inicial a 94°C por 5 minutos; seguida de 40 ciclos a 94°C por 30 segundos, 63°C por 1 minuto e 72°C por 1 minuto; e extensão final a 72°C por 7 minutos. Um controle negativo (PCR sem DNA e usando água como *template*) foi realizado para comprovar a ausência de contaminação dos componentes da PCR em cada série de reações. Os produtos da PCR foram submetidos a eletroforese em gel de agarose a 1,5% corado com SYBR® Safe DNA Gel Stain (Invitrogen™) e, então, o gel foi analisado sob luz ultravioleta e fotografado no ImageQuant™ (GE Healthcare).

TABELA 6 - *Primers* utilizados no estudo.

<i>Primer</i>	Sequência
JP-ADAMTS2Forward	5'-GCCGCCTCTTCTACAATGTTAC-3'
JP-ADAMTS2Reverse	5'-ACAAGGCCGTACTCACCA-3'

4.5 Purificação dos produtos de PCR e sequenciamento

Os produtos de PCR com tamanho específico (231 pb) foram purificados com o GenElute™ PCR Clean-Up Kit (Sigma-Aldrich®), seguindo as recomendações do fabricante e submetidos ao sequenciamento direto no 3.500 Genetic Analyzers (Applied Biosystems®) com 5 µL do *primer* JP-ADAMTS2Reverse, 10 µL do produto de PCR purificado e o BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems®). A etapa final de sequenciamento foi realizada nas dependências do Laboratório de Diagnóstico Molecular, Instituto de Biociências, Unesp, Campus de Botucatu como serviços de terceiros.

As sequências e os eletroferogramas obtidos foram analisados no programa Sequencher® versão 5.1 (Gene Codes Corporation) e comparados com a sequência normal do gene *ADAMTS2* dos ovinos (GenBank™ JF357978.1) com a ferramenta *on line* BLAST (Basic Local Alignment Search Tool, <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) para identificar os animais carreadores do SNP causador da dermatosparaxia.

4.6 Análise estatística

Estatísticas descritivas foram realizadas para os resultados obtidos e as prevalências de animais heterozigotos desse estudo e de outros estudos (ZHOU et al., 2012; GOUVEIA et al., 2016) foram comparadas pelo teste do qui-quadrado utilizando o programa GraphPad Prism® versão 5.01 para Windows (GraphPad Software). Diferença estatística foi considerada para $P \leq 0,05$.

5. Resultados

Apesar de o valor calculado para o tamanho da amostra ter sido de 253 animais, coletou-se sangue de 303 ovinos White Dorper, em que 230 (75,9%) eram fêmeas e 73 (24,1%) eram machos. Das 20 propriedades rurais criadoras da raça encontradas no estado de São Paulo, 12 foram visitadas, ou seja, 60%. Entretanto, todas as 20 foram contatadas e informadas dos objetivos do estudo. As 12 cabanhas visitadas pertenciam a seis mesorregiões do estado de São Paulo e a mesorregião de Campinas forneceu o maior número de animais coletados (Tabela 8). Em média, 25 animais foram amostrados por cabanha e todos os responsáveis assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

TABELA 7 – Número de propriedades rurais visitadas e de animais amostrados de acordo com as mesorregiões do estado de São Paulo.

Mesorregião	Propriedades visitadas	Animais amostrados
Assis	2	58
Bauru	3	52
Campinas	4	108
Macro Metropolitana Paulista	1	44
Ribeirão Preto	1	14
São José do Rio Preto	1	27
Total	12	303

Animais com sinais clínicos compatíveis com dermatosparaxia já tinham sido observados, no passado, em 25% (3/12) das propriedades rurais visitadas, embora os proprietários desconhecêssem a causa da doença, suspeitavam de origem genética. Os responsáveis pelas cabanhas visitadas não conheciam a enfermidade, inclusive em outras espécies animais.

A extração do DNA genômico das amostras sanguíneas foi realizada dentro de um período máximo de 48 horas após a coleta e todas foram incluídas no estudo. Não houve nenhuma ocorrência durante os procedimentos da PCR e os *primers* utilizados amplificaram um fragmento de 231 pb do gene *ADAMTS2*, que após purificação, foi enviado para sequenciamento no Laboratório de Diagnóstico Molecular, Instituto de Biociências, Unesp, Campus de Botucatu.

A análise do sequenciamento revelou que foi identificado animais heterozigotos (A/N) em 83% (10/12) das propriedades rurais (Tabela 9), entretanto durante as visitas técnicas não foram identificados animais com a doença clínica. Além disso, 256 (84,5%) animais foram classificados como *Wild Type* (N/N), ou seja, não carregavam o alelo contendo o SNP c.421G>T no éxon 2 do gene *ADAMTS2*. Enquanto que 47 (15,5%) animais eram carreadores desse SNP em apenas um alelo (heterozigotos, A/N) (Figura 4). Portanto, a frequência alélica do SNP na população estudada foi de 7,8%.

TABELA 8 - Perfil das propriedades rurais visitadas quanto à presença de animais *Wild Type*, heterozigotos, afetados no passado e se a etiologia da dermatosparaxia era conhecida.

	<i>Wild Type</i> (N/N)	Heterozigotos (A/N)	Número de animais amostrados	Animais afetados no passado	Conhecia a etiologia
Propriedade A	78,1%	21,9%	32	Não	Não
Propriedade B	78,6%	21,4%	14	Não	Não
Propriedade C	81,3%	18,7%	16	Não	Não
Propriedade D	100,0%	0,0%	23	Não	Não
Propriedade E	92,6%	7,4%	27	Sim	Não
Propriedade F	81,8%	18,2%	44	Sim	Não
Propriedade G	77,8%	22,2%	27	Não	Não
Propriedade H	61,5%	38,5%	13	Sim	Não
Propriedade I	73,1%	26,9%	26	Não	Não
Propriedade J	90,0%	10,0%	40	Não	Não
Propriedade K	88,9%	11,1%	18	Não	Não
Propriedade L	100,0%	0,0%	23	Não	Não

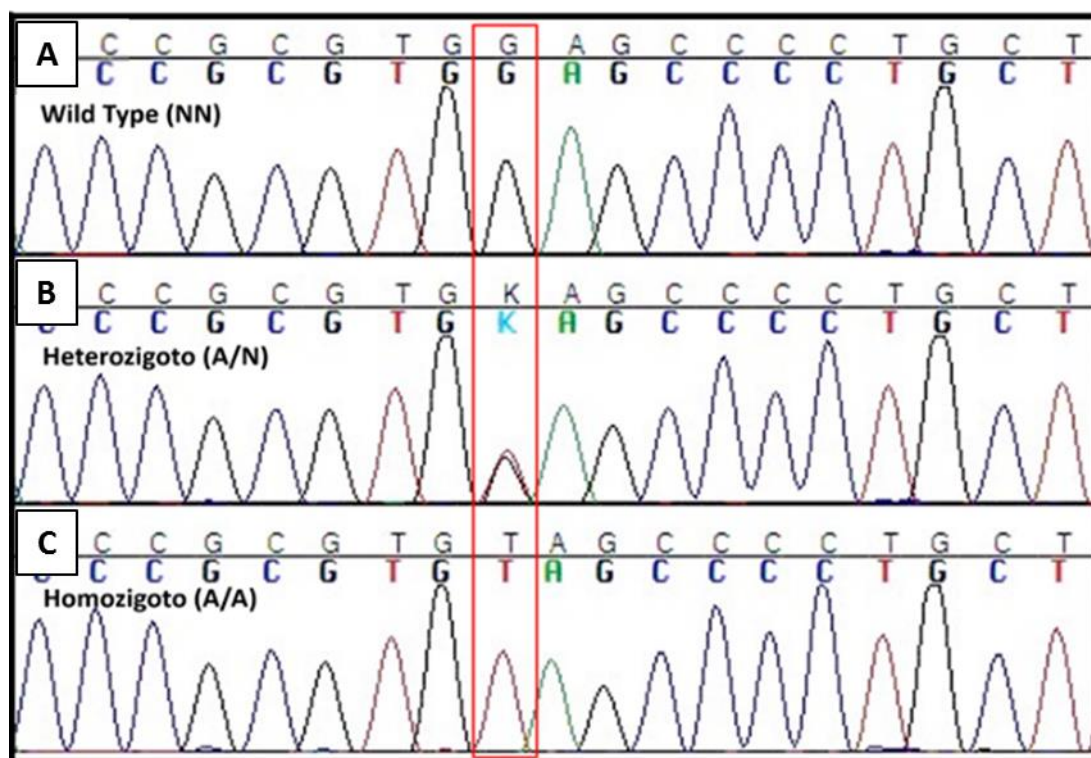


FIGURA 4 – Eletroferogramas de três ovinos White Dorper (A: *Wild Type*; B: heterozigoto; C: homozigoto recessivo). O animal homozigoto recessivo pertenceu ao estudo de Andrade et al. (2014).

6. Discussão

O número de animais amostrados foi superior ao tamanho amostral mínimo necessário, para estimar a frequência alélica do SNP c.421G>T no gene *ADAMTS2* em ovinos White Dorper no estado de São Paulo (considerando-se população de 9.772 animais (ARCO, 2015); prevalência de animais heterozigotos antecipada de 21,5% (ZHOU et al., 2012) e intervalo de confiança de 95%). Além disso, a quantidade de 303 ovinos seria suficiente para estimar a frequência alélica desse SNP no rebanho nacional de ovinos White Dorper. Entretanto, uma quantidade mais significativa de amostras provenientes de animais de outros estados brasileiros contribuiria para diminuir um possível erro amostral ou amostra viciada. Porém, levando-se em consideração que São Paulo possui o maior número de ovinos White Dorper registrados comparado com os outros estados do Brasil (ARCO, 2015), amostras de ovinos White Dorper provenientes das cabanhas paulistas podem caracterizar genotipicamente o rebanho nacional melhor que amostras dos outros estados brasileiros, isoladamente.

Durante as visitas para coleta de material, observou-se que todos proprietários, funcionários e médicos veterinários desconheciam a dermatosparaxia, entretanto suspeitavam da possibilidade de existir uma enfermidade de caráter genético cujos sinais clínicos fossem pele frágil e hiperextensível, uma vez que em 25% (3/12) das propriedades rurais visitadas, animais com os sinais clínicos da doença já tinham sido observados no passado. Além disso, atitudes para o controle da enfermidade não eram adotadas, já que nas mesmas cabanhas (25%, 3/12) o acasalamento que produziu animais afetados, era por vezes repetido. O desconhecimento da enfermidade e de sua importância pode ter sido um fator para a não autorização de algumas cabanhas à visita para amostragem, contudo o número de animais coletados foi adequado. Além disso, as pessoas envolvidas na criação dos ovinos ficaram satisfeitas com as informações recebidas sobre a doença e colaboraram da melhor forma possível durante as coletas.

A prevalência de animais heterozigotos deste trabalho (15,5%) não foi significativamente diferente da observada em um estudo desenvolvido na Nova Zelândia (ZHOU et al., 2012), em que foram amostrados 223 ovinos White Dorper de 10 propriedades rurais (21,5%; 48/223) ($P = 0,0765$). Gouveia et al.

(2016) encontraram 10,6% (7/66) de animais heterozigotos em rebanhos da Bahia e de Sergipe, valor também semelhante estatisticamente ($P = 0,3069$) com esta pesquisa. Entretanto, se os resultados do presente estudo fossem somados aos do estudo de Gouveia et al. (2016), ou seja, 54 animais heterozigotos em uma população amostral de 369 ovinos White Dorper (14,6%; 54/369), e fossem comparados com o estudo neozelandês (ZHOU et al., 2012) encontrar-se-ia o valor de $P = 0,0315$ e, portanto, a prevalência de animais heterozigotos para o SNP c.421G>T no gene *ADAMTS2* seria estatisticamente mais elevada na Nova Zelândia que no Brasil (21,5% versus 14,6%).

Ainda, o trabalho de Gouveia et al. (2016) fez uma análise de pedigree de nove gerações dos ovinos amostrados e permitiu a identificação de dois grupos distintos de animais responsáveis pela introdução do alelo com a mutação no Brasil. Um grupo proveniente de animais importados da África do Sul e outro da Austrália. Além disso, esse estudo foi o pioneiro em combinar biologia molecular com análise de pedigree para o melhor entendimento da origem de doenças genéticas em nosso país.

Outro estudo avaliou a prevalência de animais heterozigotos provenientes das amostras submetidas ao laboratório de genética do *Elizabeth Macarthur Agricultural Institute* (EMAI) na Austrália e obteve como resultado 15,3% de animais heterozigotos entre 2006 e 2012 (KELLY, 2012). As amostras foram enviadas da Nova Zelândia, África do Sul e Austrália, no entanto a razão para o teste era desconhecida, assim como se havia amostras repetidas. Portanto, pode não representar a prevalência de animais com o SNP c.421G>T, em heterozigose, na população White Dorper desses países (KELLY, 2012).

Um SNP *missense* foi recentemente identificado no quarto éxon do gene *ADAMTS2*. Este SNP, em homozigose, foi a causa da dermatosparaxia em um cordeiro mestiço, também com padrão de herança autossômica recessiva (MONTEAGUDO et al., 2015). No presente estudo, não foi realizado teste genético para SNPs no éxon 4 do gene *ADAMTS2*, já que o objetivo do estudo foi investigar o SNP c.421G>T no éxon 2 e que a literatura consultada aborda este como o principal causador da dermatosparaxia em ovinos da raça White Dorper.

Semelhante à dermatosparaxia, a maioria das doenças genéticas que afetam os ovinos é de herança autossômica recessiva (BASRUR & YADAV,

1990). Por isso, a adoção de medidas de controle para identificar os animais heterozigotos é imprescindível. Essas medidas podem minimizar significativas perdas econômicas referentes aos animais afetados, já que o cruzamento de animais heterozigotos, fenotipicamente normais, podem produzir cordeiros afetados. Doenças genéticas que afetam os ruminantes são relativamente comuns e podem ser economicamente importantes em certas raças. No entanto, podem ser controladas de uma maneira eficaz e com baixo custo (JOLLY, 2002). A implementação de programas de controle de doenças genéticas em animais depende de investimentos em pesquisa, bem como da cooperação entre criadores, pesquisadores e instituições. Esses programas podem produzir um resultado superior quando as associações de criadores das raças estão envolvidas devido à gestão de registros dos animais. Espera-se que com este estudo um programa de controle para a dermatosparaxia seja desenvolvido no rebanho nacional de ovinos White Dorper.

7. Conclusão

Os achados desse estudo permitiram estimar a frequência alélica do SNP c.421G>T no gene *ADAMTS2* no rebanho paulista de ovinos White Dorper. O valor encontrado foi de 7,8%. Nesse sentido, a PCR seguida do sequenciamento gênico se mostraram ferramentas seguras para a determinação do genótipo dos ovinos amostrados. Além disso, verificou-se que a dermatosparaxia é pouco conhecida entre os criadores paulistas de ovinos White Dorper.

8. Bibliografia

AGGS, R. Screen test for fragile skin. *Ag. Today*, 2007. Disponível em: <<http://www.dpi.nsw.gov.au/archive/agriculture-today-stories/ag-today-archives/august-2007/fragile-skin>>. Acesso em: 17 jul. 2015.

ALLEY, M.R.; O'HARA, P.J.; MIDDELBERG, A. An epidermolysis bullosa of sheep. *N. Z. Vet. J.*, v.22, n.4, p.55-59, 1974.

ANDRADE, D.G.A.; PAVAN, L.F.; AMORIM, R.M.; CHIACCHIO, S.B.; LAUFER-AMORIM, R.; GONÇALVES, R.C.; BORGES, A.S.; OLIVEIRA-FILHO, J.P. Aspectos clínicos, histopatológicos e moleculares da dermatosparaxia em ovinos White Dorper. *Pesq. Vet. Bras.*, v.34, n.5, p.442-448, 2014.

ARTHUR, D.G.; THOMPSON, K.G.; SWARBRICK, P. Lethal osteogenesis imperfecta and skin fragility in newborn New Zealand Romney lambs. *N. Z. Vet. J.*, v.40, n.3, p.112-116, 1992.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE CRIADORES DE OVINOS (ARCO). *Padrões Raciais – White Dorper*. Bagé/RS, 2016. Disponível em: <http://www.arcoovinos.com.br/sitenew/racas_links/white_dorper.htm>. Acesso em: 18 jul. 2016.

ATROSHI, F.; HENRIKSSOLN, K.; LINDBERG, L.A.; MULTIA, M. A heritable disorder of collagen tissue in Finnish crossbred sheep. *Zbl. Vet. Med. A.*, v.30, p.233-241, 1983.

ÁVILA, V.S.; FRUET, A.P.B.; BARBIERI, M.; BIANCHINI, N.H.; DÖRRS, A.C. O retorno da ovinocultura ao cenário produtivo do Rio Grande do Sul. *REGET*, v.11, n.11, p.2419-2426, 2013.

BARNETT, K.C.; COTTRELL, B.D. Ehlers-Danlos syndrome in a dog: ocular, cutaneous and articular abnormalities. *J. Small Anim. Pract.*, v.28, p. 941-946, 1987.

BASRUR, P.K.; YADAV, B. Genetic diseases of sheep and goats. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.*, v.6, n.3, p.779-802, 1990.

BAVINTON, J.H.; PETERS, D.E.; RAMSHAW, J.A. A morphologic study of a mild form of ovine dermatosparaxis. *J. Invest. Dermatol.*, v.84, n.5, p.391-395, 1985.

BECKER, U.; TIMPL, R.; HELLE, O.; PROCKOP, D.J. NH₂-terminal extensions on skin collagen from sheep with a genetic defect in conversion of procollagen into collagen. *Biochemistry*, v.15, p.2853-2862, 1976.

BELL, N. New gene test to help eradicate dermatosparaxis in sheep. *The Weekly Times*, Melbourne, 03. set. 2014. Sheep & Wool. Disponível em: <<http://www.weeklytimesnow.com.au/agribusiness/sheep/new-gene-test-to-help-eradicate-dermatosparaxis-in-sheep/news-story/dcf50742b0c4d166e33c35dc3c0a67>> Acesso em: 27 jul. 2016.

BENITAH, N.; MATOUSEK, J.L.; BARNES, R.F.; LICHTENSTEIGER, C.A.; CAMPBELL, K.L. Diaphragmatic and perineal hernias associated with cutaneous asthenia in a cat. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, v.224, n.5, p.706-709, 2004.

CHRISTOPHERSEN, C.; ADAMS, J.E. Ehlers-Danlos syndrome. *J. Hand Surg. Am.*, v.39, n.12, p.2542-2544, 2014.

COLIGE, A.; SIERON, LI, S.W.; SCHWARZE, U.; PETTY, E.; WERTELECKI, W.; WILCOX, W.; KRAKOW, D.; COHN, D.H.; REARDON, W.; BYERS, P.H.; LAPIÈRE, C.H.; PROCKOP, D.J.; NUSGENS, B.V. Human Ehlers-Danlos syndrome type VII C and bovine dermatosparaxis are caused by mutations in the procollagen I N-proteinase gene. *Am. J. Hum. Genet.*, v.65, n.2, p.308-317, 1999.

COLIGE, A.; NUYTINCK, L.; HAUSSE, I.; VAN ESSEN, A.J.; THIRY, M.; HERENS, C.; ADÈS, L.C.; MALFAIT, F.; PAEPE, A.D.; FRANCK, P.; WOLFF, G.; OOSTERWIJK, J.C.; SMITT, J.H.S.; LAPIÈRE, C.M.; NUSGENS, B.V. Novel types of mutation responsible for the dermatosparactic type of Ehlers-Danlos syndrome (Type VIIC) and common polymorphisms in the *ADAMTS2* gene. *J. Invest. Dermatol.*, v.123, n.4, p.656-663, 2004.

COUNTS, D.F.; BYERS, P.H.; HOLBROOK, K.A.; HEGREBERG, G.A.
Dermatosparaxis in a Himalayan cat: I. Biochemical studies of dermal collagen.
J. Invest. Dermatol., v.74, p.96-99, 1980.

CUNHA, S.M.F.; ALMEIDA, E.M.; NOGUEIRA, J.F.; SOUZA FILHO, J.L.P.;
MENEZES, D.R.; GOUVEIA, G.V.; GOUVEIA, J.J.S. Diagnóstico molecular da
astenia cutânea em ovinos da raça White Dorper. In: XX ENGENE -
ENCONTRO DE GENÉTICA DO NORDESTE, Campina Grande. *Anais...*,
2014. p.8.

DECKER, S.R.F.; FERNANDES, D.A.C.; GOMES, M.C. Gestão competitiva na
produção de ovinos. *Revista Agropampa*, v.1, n.1, p.113-122, 2016.

FJØLSTAD, M.; HELLE, O. A hereditary dysplasia of collagen tissues in sheep.
J. Pathol., v.112, p.183-188, 1974.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS
(FAO). *FAOSTAT*. Disponível em: <<http://www.fao.org/faostat/en/#home>>
Acesso em: 02 jan 2017.

GENTILI, A.; TESTONI, S. Inherited disorders of cattle: a selected review. *Slov.
Vet. Res.*, v.43, n.1, p.17-29, 2006.

GOUVEIA, J.J.S.; CUNHA, S.M.F.; ALMEIDA, E.M.; NOGUEIRA, J.F.; SOUZA
FILHO, J.L.P.; MENEZES, D.R.; VENERONI-GOUVEIA, G. Molecular and
genealogical analyses reveal multiple sources of the mutation associated with
dermatosparaxis in Brazilian White Dorper sheep. *Small Rumin. Res.*, v.140,
p.46-49, 2016.

GRANT, D.; PATTON, W. Dermatosparaxis in White Dorpers. 2012. Disponível
em: <http://www.dorper.org/PDF_SALE/DERMATOSPARAXIS.pdf>. Acesso
em: 03 mar. 2014.

GRIFFITHS, A.J.F.; WESSLER, S.R.; CARROLL, S.B.; DOEBLEY, J.
Introdução à Genética. 11.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2016. 749p.

IBEAGHA-AWEMU, E.M.; KGWATALALA, P.; IBEAGHA, A.E.; ZHAO, X. A critical analysis of disease-associated DNA polymorphisms in the genes of cattle, goat, sheep, and pig. *Mamm. Genome*, v.19, p.226-245, 2008.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). *Pesquisa Pecuária Municipal*. Disponível em:

<<http://www.sidra.ibge.gov.br/bda/tabela/listabl.asp?c=3939&z=p&o=28>>

Acesso em: 02 dez. 2015.

JOLLY, R.D. Screening for genetic diseases in cattle. *Aust. Vet. J.*, v.80, n.5, p.284-285, 2002.

JOLLY, R.D.; BLAIR, H.T.; JOHNSTONE, A.C. Genetic disorders of sheep in New Zealand: A review and perspective. *N. Z. Vet. J.*, v.52, n.2, p.52-64, 2004.

KAWAGUCHI, T.; FUKAZAWA, H.; NAITO, Y.; OKADA, K. Dermal dysplasia characterized by collagen disorder-related skin fragility in a cow. *Am. J. Vet. Res.*, v.49, p.965-971, 1988.

KELLY, J. Dermatosparaxis in a White Dorper flock. *Flock and Herd*, 2012.

Disponível em:

<<http://www.flockandherd.net.au/sheep/reader/dermatosparaxis.html>> Acesso

em: 23 jul. 2015.

LAPIÈRE, C.M.; LENAERS, A.; KOHN, L.D. Procollagen peptidase: an enzyme excising the coordination peptides of procollagen. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, v.68, n.12, p.3054-3058, 1971.

LAU, H.D. Dermatosparaxis in buffalo: a case report. *Buffalo Bull.*, v.16, n.2, p.46, 1997.

LINCOLN UNIVERSITY. Gene-marker Laboratory. Dermatosparaxis gene test.

Disponível em:

<<http://www.lincoln.ac.nz/PageFiles/22452/Dermatosparaxis%20Gene%20Test.pdf>> Acesso em: 27 jul. 2016.

LÜHKEN, G. Genetic testing for phenotype-causing variants in sheep and goats. *Mol. Cell. Probes*, v.26, n.6, p.231-237, 2012.

MARTINS, V.N.; MARCHETTI, M.E.; GARCIA, R.G. Qualidade da carne de ovinos: depende do bem estar do animal na produção. *Cadernos de Agroecologia*, v.9, n.4, p.1-8, 2014.

MONTEAGUDO, L.V.; FERRER, L.M.; CATALAN-INSA, E.; SAVVA, D.; MCGUFFIN, L.J.; TEJEDOR, M.T. *In silico* identification and three-dimensional modelling of the missense mutation in ADAMTS2 in a sheep flock with dermatosparaxis. *Vet. Dermatol.*, v.26, p.49-e16, 2015.

OSTMEIER, M.; KERKMANN, A.; FRASE, R.; GANTER, M.; DISTL, O.; HEWICKER-TRAUTWEIN, M. Inherited junctional epidermolysis bullosa (Herlitz type) in German black-headed mutton sheep. *J. Comp. Pathol.*, v.146, n.4, p.338-347, 2012.

PACIELLO, O.; LAMAGNA, F.; LAMAGNA, B.; PAPPARELLA, S. Ehlers-Danlos-like syndrome in 2 dogs: clinical, histologic, and ultrastructural findings. *Vet. Clin. Pathol.*, v.32, p.13-18, 2003.

PAEPE, A.D.; MALFAIT, F. Bleeding and bruising in patients with Ehlers-Danlos syndrome and other collagen vascular disorders. *Br. J. Haematol.*, v.127, n.5, p.491-500, 2004.

PÉREZ, V.; BENAVIDES, J.; DELGADO, L.; REYES, L.E.; GARCÍA MARÍN, J.F.; FERRERAS, M.C. Dystrophic epidermolysis bullosa in Assaf lambs. *J. Comp. Pathol.*, v.145, n.2-3, p.226-230, 2011.

PETTY, E.M.; SEASHORE, M.R.; BRAVERMAN, I.M.; SPIESEL, S.Z.; SMITH, L.T.; MILSTONE, L.M. Dermatosparaxis in children. A case report and review of the newly recognized phenotype. *Arch. Dermatol.*, v.129, n.10, p. 1310-1315, 1993.

PILAN, G.J.G. *Perfil sócio-econômico e diretrizes para a gestão do agronegócio da ovinocultura no estado de São Paulo*. 2013. 76f. Dissertação (Mestrado) –

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.

RADOSTITIS, O.M.; GAY, C.C.; BLOOD, D.C.; HINCHCLIFF, K.W. *Clínica veterinária: um tratado de doenças dos bovinos, ovinos, suínos, caprinos e eqüinos*. 9.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002. 1737p.

RAINERI, C.; SANTOS, F.F.; GAMEIRO, A.H. Ovinocultura de corte no Brasil: balanço de 2013 e perspectivas para 2014. *Rev. Educ. Contin. Med. Vet. Zootec. CRMV-SP*, v.12, n.3, p.12-17, 2014.

RAMSHAW, J.A.; PETERS, D.E.; JONES, L.N.; BADMAN, R.T.; BRODSKY, B.B. Ovine dermatosparaxis. *Aust. Vet. J.*, v.60, p.149-151, 1983.

RAMSHAW J.A. A mild form of ovine dermatosparaxis. *Coll. Relat. Res.*, v.4, p.441-451, 1984.

ROSANOVA, C.; SILVA SOBRINHO, A.G.; GONZAGA NETO, S. A raça Dorper e sua caracterização produtiva e reprodutiva. *Vet. Not.*, v.11, n.1, p.127-135, 2005.

SCOTT D.W. *Color Atlas of Farm Animal Dermatology*. Ames: Blackwell Publishing Professional, 2007. 252p.

SILVA, A.P.C.; MOL, J.P.S.; CARVALHO JUNIOR, C.A.; PAIXÃO, T.A.; SANTOS, R.L. Dermatosparaxis in two White Doper lambs in Brazil: case report. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.67, n.3, p.741-746, 2015.

SINKE, J.D.; VAN DIJK, J.E.; WILLEMSE, T. A case of Ehlers-Danlos-like syndrome in a rabbit with a review of the disease in other species. *Vet. Quart.* v.19, n.4, p.182-185, 1997.

SOUZA, F.A.A.; LOPES, M.A.; DEMEU, F.A. Panorama da ovinocultura no estado de São Paulo. *Rev. Ceres*, v.55, n.5, p.384-388, 2008.

STAUDT, N.P.; SILVA, R.O.P. Perspectiva da produção de ovinos no estado de São Paulo. *A/A*, v.3, n.5, p.1-4, 2008.

STEINMAN, B.; ROYCE, P.M.; SUPERTI-FURGA, A. The Ehlers–Danlos syndrome. In: ROYCE, P.M.; STEINMAN, B. *Connective Tissue and its Heritable Disorders: Molecular, Genetic, and Medical Aspects*. 2.ed. New York: Wiley-Liss, Inc., 2002. chap.9, pp. 431–523.

SUCUPIRA, M.C.A.; ARCAUTE, M.R.; LACASTA, D.; PÉREZ, M.J.; RAMOS, J.J.; VERDE, M.T.; FERRER, L.M. Enfermedades congénitas y hereditarias de la piel de los cordeiros (I). *Albéitar*, n.128, p.36-37, 2009.

TEMPLETON, A.R. *Population genetics and microevolutionary theory*. Hoboken: Wiley-Liss, 2006. 720p.

URI, M.; VERIN, R.; RESSEL, L.; BUCKLEY, L.; MCEWAN, N. Ehlers-Danlos syndrome associated with fatal spontaneous vascular rupture in a dog. *J. Comp. Pathol.*, v.152, n.2-3, p.211-216, 2015.

VAATSTRA, B.L.; HALLIDAY, W.D.; WAROPASTRAKUL, S. Dermatosparaxis in two white Dorper lambs. *N. Z. Vet. J.*, v.59. n.5, p.258-60, 2011.

VAN HALDEREN, A.; GREEN, J.R. Dermatosparaxis in White Dorper sheep. *J. S. Afr. Vet. Assoc.*, v.59, n.1, p.45, 1988.

VAN WEEREN-KEVERLING BUISMAN, .A.; KOEMAN, J.P. A form of dermatosparaxis in a Texel lamb. *Tijdschr. Diergeneeskd.*, v.111, p.173-177, 1986.

VIANA, J.G.A. Panorama Geral da Ovinocultura no Mundo e no Brasil. *Revista Ovinos*, n.12, 2008.

WHITE, S.D.; AFFOLTER, V.K.; BANNASCH, D.L.; SCHULTHEISS, P.C.; HAMAR, D.W.; CHAPMAN, P.L.; NAYDAN, D.; SPIER, S.J.; ROSYCHUK, R.A.; REES, C.; VENEKLASEN, G.O.; MARTIN, A.; BEVIER, D.; JACKSON, H.A.; BETTENAY, S.; MATOUSEK, J.; CAMPBELL, K.L.; IHRKE, P.J. Hereditary equine regional dermal asthenia ('hyperelastosis cutis') in 50 horses: clinical, histological, immunohistological and ultrastructural findings. *Vet. Dermatol.*, v.15, n.4, p.207-217, 2004.

YILMAZ, K.; ÇİMTAY, I.; ELİTOK, B.; METİN, N.; YAMAN, I.; SAKI, C.E. Bir kuzuda dermatosparaxis olgusu. *Tr. J. Vet. Anim. Sci.*, v.22, p.83-88, 1998.

ZHOU, H.; HICKFORD, J.G.; FANG, Q. A premature stop codon in the ADAMTS2 gene is likely to be responsible for dermatosparaxis in Dorper sheep. *Anim. Genet.*, v.43, n.4, p.471-473, 2012.

9. Trabalhos científicos

Trabalho publicado na revista “Pesquisa Veterinária Brasileira”, cujas normas se encontram a seguir:

INSTRUÇÕES AOS AUTORES

Os artigos devem ser submetidos através do Sistema Scholar One, link <<https://mc04.manuscriptcentral.com/pvb-scielo>>, com os arquivos de texto na versão mais recente do Word e formatados de acordo com o modelo de apresentação disponíveis no ato de submissão e no site da revista (www.pvb.com.br). Devem constituir-se de resultados de pesquisa ainda não publicados e não considerados para publicação em outro periódico.

Apesar de não serem aceitas comunicações (Short communications) sob a forma de “Notas Científicas”, não há limite mínimo do número de páginas do artigo enviado.

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

NOTE: Em complementação aos recursos para edição da revista é cobrada taxa de publicação (paper charge) no valor de R\$ 1.500,00 por artigo editorado, na ocasião do envio da prova final, ao autor para correspondência.

1. Os artigos devem ser organizados em Título, ABSTRACT, RESUMO, INTRODUÇÃO, MATERIAL E MÉTODOS, RESULTADOS, DISCUSSÃO, CONCLUSÕES, Agradecimentos e REFERÊNCIAS:

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

b) **O(s) Autor(es) deve(m) sistematicamente abreviar seus nomes quando compridos**, mas mantendo o primeiro nome e o último sobrenome por extenso, como por exemplo: Paulo Fernando de Vargas Peixoto escreve Paulo V. Peixoto (inverso, Peixoto P.V.); Franklin Riet-Correa Amaral escreve Franklin Riet-Correa (inverso, Riet-Correa F.). **Os artigos devem ter no máximo 8 (oito) autores;**

c) o **ABSTRACT** deve ser uma versão do RESUMO em português, podendo ser mais explicativo, seguido de “INDEX TERMS” que incluem palavras do título;

d) o **RESUMO** deve conter o que foi feito e estudado, indicando a metodologia e dando os mais importantes resultados e conclusões, seguido dos “TERMOS DE INDEXAÇÃO” que incluem palavras do título;

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

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

g) em **RESULTADOS** deve ser feita a apresentação concisa dos dados obtidos. **Quadros** (em vez de Tabelas) devem ser preparados sem dados supérfluos, apresentando, sempre que indicado, médias de várias repetições. É conveniente expressar dados complexos, por gráficos (=Figuras), ao invés de apresentá-los em Quadros extensos;

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

i) as **CONCLUSÕES** devem basear-se somente nos resultados apresentados;

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

k) a Lista de **REFERÊNCIAS**, que só incluirá a bibliografia citada no artigo e a que tenha servido como fonte para consulta indireta, deverá ser ordenada alfabética e cronologicamente, pelo sobrenome do primeiro autor, seguido dos demais autores (todos), em caixa alta e baixa, do ano, do título da publicação citada, e, abreviado (por extenso em casos de dúvida), o nome do periódico ou obra, usando sempre como exemplo os últimos fascículos da revista (www.pvb.com.br).

2. Na elaboração do texto devem ser atendidas as seguintes normas:

a) A digitação deve ser na fonte **Cambria, corpo 10, entrelinha simples**; a **página** deve ser **no formato A4, com 2cm de margens** (superior, inferior,

esquerda e direita), o texto deve ser corrido e não deve ser formatado em duas colunas, com as legendas das Figuras no final (logo após as REFERÊNCIAS). As Figuras e os Quadros devem ter seus arquivos fornecidos separados do texto. Os nomes científicos devem ser escritos por extenso no início de cada capítulo.

b) a redação dos artigos deve ser concisa, com a linguagem, tanto quanto possível, no passado e impessoal; no texto, os sinais de chamada para notas de rodapé serão números arábicos colocados em sobrescrito após a palavra ou frase que motivou a nota. Essa numeração será contínua por todo o artigo; as notas deverão ser lançadas ao pé da página em que estiver o respectivo número de chamada, **sem o uso do “Inserir nota de fim”, do Word**. Todos os Quadros e todas as Figuras têm que ser citados no texto. Estas citações serão feitas pelos respectivos números e, sempre que possível, em ordem crescente. ABSTRACT e RESUMO serão escritos corridamente em um só parágrafo e não devem conter citações bibliográficas.

c) **no rodapé da primeira página deverá constar endereço profissional completo de todos os autores (na língua do país dos autores), o e-mail do autor para correspondência e dos demais autores**. Em sua redação deve-se usar vírgulas em vez de traços horizontais;

d) siglas e abreviações dos nomes de instituições, ao aparecerem pela primeira vez no artigo, serão colocadas entre parênteses, após o nome da instituição por extenso;

e) citações bibliográficas serão feitas pelo sistema “autor e ano”; artigos de até dois autores serão citados pelos nomes dos dois, e com mais de dois, pelo nome do primeiro, seguido de “et al.”, mais o ano; se dois artigos não se distinguirem por esses elementos, a diferenciação será feita através do acréscimo de letras minúsculas ao ano. **Artigos não consultados na íntegra pelo(s) autor(es), devem ser diferenciados, colocando-se no final da respectiva referência, “(Resumo)” ou “(Apud Fulano e o ano.)”**; a referência do artigo que serviu de fonte, será incluída na lista uma só vez. A menção de comunicação pessoal e de dados não publicados é feita no texto somente com citação de Nome e Ano, colocando-se na lista das Referências dados adicionais, como a Instituição de origem do(s) autor(es). Nas citações de artigos colocados cronologicamente entre parênteses, **não se usará vírgula entre o nome do autor e o ano, nem ponto-e-vírgula após cada ano**, como por

exemplo: (Priester & Haves 1974, Lemos et al. 2004, Krametter-Froetcher et. al. 2007);

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

3. Os gráficos (=Figuras) devem ser produzidos em 2D, com colunas em branco, cinza e preto, sem fundo e sem linhas. A chave das convenções adotadas será incluída preferentemente, na área do gráfico (=Figura); evitar-se-á o uso de título ao alto do gráfico (=Figura).

4. **As legendas explicativas das Figuras devem conter** informações suficientes para que estas sejam compreensíveis, (até certo ponto autoexplicativas, independente do texto).

5. **Os Quadros devem ser** explicativos por si mesmos. Entre o título (em negrito) e as colunas deve vir o cabeçalho entre dois traços longos, um acima e outro abaixo. **Não há traços verticais, nem fundos cinzas.** Os sinais de chamada serão alfabéticos, recomeçando, se possível, com “a” em cada Quadro; as notas serão lançadas logo abaixo do Quadro respectivo, do qual serão separadas por um traço curto à esquerda.

Prevalence study of SNP c.421G>T in the ADAMTS2 gene responsible for dermatosparaxis in White Dorper sheep in Brazil¹

Danilo G. A. Andrade², Felipe M. Dalanezi², Anelize S. Trecenti², Paulo Henrique J. Cunha³, Alexandre S. Borges² and José P. Oliveira-Filho^{2*}

ABSTRACT.- Andrade D.G.A., Dalanezi F.M., Trecenti A.S., Cunha P.H.J., Borges A.S. & Oliveira-Filho J.P. 2016. **Prevalence study of SNP c.421G>T in the ADAMTS2 gene responsible for dermatosparaxis in White Dorper sheep in Brazil.** *Pesquisa Veterinária Brasileira* 36(2):73-76. Departamento de Clínica Veterinária, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Campus de Botucatu, Distrito de Rubião Junior s/n, Botucatu, SP 18618-970, Brazil. E-mail: zefilho@fmvz.unesp.br

Dermatosparaxis is an autosomal recessive disorder of connective tissue; the disorder is clinically characterized by skin fragility and hyperextensibility. Dermatosparaxis in White Dorper sheep is caused by a single nucleotide polymorphism (SNP) (c.421G>T) in the ADAM metalloproteinase with thrombospondin type 1 motif, 2 (ADAMTS2) gene. The aim of this study was to investigate the prevalence of this SNP in a White Dorper herd in São Paulo state, Brazil. In this study, we collected blood DNA samples from 303 White Dorper sheep and performed polymerase chain reaction to amplify the SNP region. The samples were sequenced to determine the presence of the SNP in the ADAMTS2 gene. The SNP prevalence in the studied population was 15.5%; this finding indicates that more effective control measures should be used to prevent the inheritance of SNP c.421G>T in the ADAMTS2 gene in Brazilian White Dorper herds.

INDEX TERMS: Cutaneous asthenia, autosomal recessive, PCR, White Dorper, sheep.

¹ Received on September 24, 2015.

Accepted for publication on January 15, 2016.

² Departamento de Clínica Veterinária, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista (Unesp), Campus de Botucatu, Distrito de Rubião Júnior s/n, Botucatu, SP 18618-000, Brazil.

*Corresponding author: zefilho@fmvz.unesp.br

³ Departamento de Medicina Veterinária, Escola de Veterinária, Universidade Federal de Goiás (UFG), Campus Samambaia (Campus II), Cx. Postal 131, Goiânia, GO 74001-970, Brazil.

RESUMO.- [Prevalência do SNP c.421G>T no gene ADAMTS2 responsável pela dermatosparaxia em ovinos White Dorper no Brasil.] A dermatosparaxia é uma doença autossômica recessiva do tecido conjuntivo, clinicamente caracterizada pela fragilidade e hiperextensibilidade da pele. A dermatosparaxia em ovinos White Dorper é causada pelo polimorfismo de base única (SNP) c.421G>T no gene ADAM metalopeptidase com trombospondina tipo 1 motif, 2 (ADAMTS2). O objetivo deste estudo foi investigar a prevalência deste SNP em ovinos White Dorper no estado de São Paulo, Brasil. Foram coletadas amostras de sangue de 303 ovinos White Dorper. O DNA foi purificado destas amostras sanguíneas e utilizado em uma reação em cadeia da polimerase (PCR) para amplificação da região do gene contendo SNP c.421G>T. Os produtos das PCR foram sequenciados para determinar o genótipo dos animais. A prevalência do SNP na população estudada foi de 15,5%, estes achados indicam que medidas de controle efetivas devem ser utilizadas para prevenir a disseminação deste SNP no rebanho brasileiro de White Dorper.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: Astenia cutânea, autossômica recessiva, PCR, White Dorper, ovinos.

INTRODUCTION

Dermatosparaxis, also known as cutaneous asthenia or cutis hyperelastica, is a heritable autosomal recessive collagen dysplasia (Scott 2007). Its clinical signs include loose, hyperextensible, and fragile skin that is easily torn by minor trauma (Fig.1) (Andrade et al. 2014). These skin defects prevent affected animals from entering the breeding system because they are either discarded or removed from their usual activities due to wound infections and septicemia (Fjølstad & Helle 1974). In humans, dermatosparaxis is part of a large spectrum of connective tissue disorders known as Ehlers-Danlos syndrome (EDS) and is classified as EDS type VIIC (Colige et al. 1999). Dermatosparaxis has previously been described in many species, including cattle (Kawaguchi et al. 1988), horses (White et al. 2004), dogs (Paciello et al. 2003), cats (Sequeira et al. 1999), and rabbits (Sinke et al. 1997). The disorder occurs predominately in White Dorper sheep and has been reported in South Africa (van Halderen & Green 1988), Australia (Aggs 2007), Spain (Sucupira et al. 2009), New Zealand (Vaatsstra et al. 2011), the United States (Grant and Patton 2012) and Brazil (Andrade et al. 2014, Silva et al. 2015). However, other breeds may also be affected (Fjølstad & Helle 1974, Ramshaw et al. 1983, van Weeren-Keverling & Koeman 1986, Monteagudo et al. 2015).

Dermatosparaxis in White Dorper sheep is caused by a single nucleotide polymorphism (SNP) in the ADAMTS2 gene (Zhou et al. 2012), which is similar to the gene found in both humans and cattle (Colige et al. 1999). This SNP results in deficient type I procollagen due to a defect in the N-terminal portion of the protein (Lapière et al. 1971). The mutant protein assembles into abnormal collagen fibrils that do not facilitate the development of normal skin (Zhou et al. 2012). There is currently no treatment for this disease. Thus, the identification of SNP c.421G>T in exon 2 of the ADAMTS2 gene prior to breeding could help control dermatosparaxis in White Dorper sheep. Heterozygous animals are phenotypically normal. Therefore, it is important to minimize the number of affected animals, thereby reducing economic losses. The aim of this study was to investigate the prevalence of the above-mentioned SNP in a White Dorper herd located in Sao Paulo state, Brazil.

MATERIALS AND METHODS

The sample size was calculated using OpenEpi software (online version 3.0.1.) by applying a 5% error margin and using a population of 9,772 registered White Dorper sheep (Brazilian Association of Sheep Breeders - ARCO - Associação Brasileira de Criadores de Ovinos) with a confidence interval of 95%. The result was a sample size of 253 animals. There have been no previous studies examining the SNP prevalence in Brazil. Therefore, the prevalence of heterozygous animals in the unaffected sheep population was estimated to be 21.5% based on a previous study from New Zealand (Zhou et al. 2012). The prevalences of heterozygous animals in our study and the study by Zhou et al. (2012) were compared using a chi-square test. All statistical tests were performed using GraphPad Prism® version 5.01 for Windows (GraphPad Software).

Genomic DNA was extracted from blood samples with the GenElute™ Genomic Blood DNA Kit (Sigma-Aldrich®) according to the manufacturer's instructions. PCR was performed using specific primers that amplify a 231-bp fragment containing the c.421G>T mutation in the ADAMTS2 gene based on a previously described method (Andrade et al. 2014). The PCR products were analyzed by 1.5% agarose gel electrophoresis. The products with the correct size were purified using the GenElute™ PCR Clean-Up Kit (Sigma-Aldrich®). To sequence the DNA, we used 10 µL of each PCR product, 5 µL of the purified reverse primer and the BigDye® Terminator Cycle Sequencing Kit (Life Technologies™, CA, USA). The sequences were determined using the ABI 3500 Genetic Analyzer (Life Technologies™ CA, USA). The obtained sequences and the electropherograms were analyzed using Sequencher™ 5.1 (Gene Codes, MI, USA). The sequences were compared with the normal sheep ADAMTS2 gene sequence (GenBank™ JF357978.1) using BLAST (Basic Local Alignment Search Tool, <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

RESULTS AND DISCUSSION

DNA from blood samples was obtained from 303 White Dorper sheep. There were 230 (75.9%) females and 73 (24.1%) males in the population, which was registered at the Brazilian Association of Sheep Breeders (ARCO). The samples were obtained from 12 farms in different regions of Sao Paulo state (Fig.2). This state was chosen because it belongs to the Brazilian zone that had the greatest increase (86.1%) in the sheep population between 2,000 and 2,012 (Raineri et al. 2014). Additionally, Sao Paulo has the largest White Dorper sheep population in the Brazilian states (ARCO) and has farms that sell their animals throughout the country.

Heterozygous animals were identified in 83% (10/12) of the sampled farms (Table 1). However, no animals with clinical signs of dermatosparaxis were identified during the technical visits. However, the owners indicated that there were clinical examples in 25% (3/12) of the sampled farms. The breeders had no knowledge regarding the cause of the animals' disease.

A total of 256 (84.5%) animals had no alleles containing the SNP c.421G>T in exon 2 of the ADAMTS2 gene (Wild Type, N/N). Forty-seven (15.5%) animals had only one affected allele (heterozygotes, A/N). The frequency of A/N animals (15.5%) was not significantly different than the frequency observed in a New Zealand study with White Dorper sheep from 10 farms (21.5%; 48/223) ($P=0.0765$) (Zhou et al. 2012).

According to the study by Kelly (2012), approximately 15.3% of the samples submitted to the genetics laboratory at Elizabeth MacArthur Agricultural Institute (EMAI) in Australia had the SNP. The samples were from New Zealand, South Africa, and Australia. However, the reason for testing is unknown; therefore, this frequency may not represent the allele frequency in the White Dorper population.

A missense SNP was recently identified in homozygosis (recessive autosomal inheritance) in the fourth exon of the ADAMTS2 gene. This SNP was the cause of dermatosparaxis in an affected lamb of a crossbreed ovine flock (Monteagudo et al. 2015). We did not test any SNPs in exon 4 of the ADAMTS2 gene because the aim of our study was to investigate the SNP c.421G>T in exon 2.

Similar to dermatosparaxis, most of the genetic diseases that affect sheep are also autosomal recessive (Basrur & Yadav 1990). Therefore, adopting control measures to identify heterozygous animals is important because these measures will minimize significant economic losses and casualties of affected animals resulting from breeding phenotypically normal heterozygous animals that can produce affected lambs.

Genetic diseases affecting ruminants are relatively common and can be economically important in certain breeds. However, these genetic diseases can be controlled in a cost effective manner (Jolly 2002). The implementation of control programs for genetic diseases in animals is complex because the programs depend on

investments in research as well as the cooperation between breeders, researchers, and institutions. These programs produce a superior response when breeding associations are involved due to their management of animal records. We hope that with this study will lead to the development of a control program for dermatosparaxis in Brazilian White Dorper herds.

CONCLUSION

These findings led us to conclude that dermatosparaxis is highly prevalent in White Dorper sheep herds in Sao Paulo state, Brazil.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors acknowledge the funding agency CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) for its financial support (AUX-PE-PREMIO - 432/2014) and for awarding a scholarship to Danilo G. A. de Andrade. In addition, we also thank all the farmers who provided their animals, and ARCO (Associação Brasileira de Criadores de Ovinos).

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflicts of interest.

REFERENCES

- Aggs R. 2007. Screen test for fragile skin. Agriculture Today. Available at <http://www.dpi.nsw.gov.au/archive/agriculture-today-stories/ag-today-archives/august-2007/fragile-skin> Accessed on July 17, 2015.
- Andrade D.G.A., Pavan L.F., Amorim R.M., Chiacchio S.B., Laufer-Amorim R., Gonçalves R.C., Borges A.S. & Oliveira-Filho J.P. 2014. Aspectos clínicos, histopatológicos e moleculares da dermatosparaxia em ovinos White Dorper. Pesq. Vet. Bras. 34:442-448.
- Basrur P.K. & Yadav B.R. 1990. Genetic diseases of sheep and goats. Vet. Clin. North Am., Food Anim. Pract. 6:779-802.
- Colige A., Sieron A.L., Li S.W., Schwarze U., Petty E., Wertelecki W., Wilcox W., Krakow D., Cohn D.H., Reardon W., Byers P.H., Lapière C.M., Prockop D.J. & Nussgens B.V. 1999. Human Ehlers-Danlos syndrome type VII C and bovine dermatosparaxis are caused by mutations in the procollagen I N-proteinase gene. Am. J. Hum. Genet. 65:308-317.
- Fjølstad M. & Helle O. 1974. A hereditary dysplasia of collagen tissues in sheep. J. Pathol. 112:183-188.
- Grant D. & Patton W. 2012. Dermatosparaxis in White Dopers. Available at <http://www.dorper.org/PDF_SALE/DERMATOSPARAXIS.pdf> Accessed on March 3, 2014.
- Jolly R.D. 2002. Screening for genetic diseases in cattle. Aust. Vet. J. 80:284- 285.
- Kawaguchi T., Fukazawa H., Naito Y. & Okada K. 1988. Dermal dysplasia characterized by collagen disorder-related skin fragility in a cow. Am. J. Vet. Res. 49:965-971.
- Kelly J. 2012. Dermatosparaxis in a white dorper flock. Flock and Herd. Available at <<http://www.flockandherd.net.au/sheep/reader/dermatosparaxis.html>> Accessed on July 23, 2015.
- Lapière C.M., Lenaers A. & Kohn L.D. 1971. Procollagen peptidase: an enzyme excising the coordination peptides of procollagen. Proc. Natl Acad. Sci. USA 68:3054-3058.
- Monteagudo L.V., Ferrer L.M., Catalan-Insa E., Savva D., McGuffin L.J. & Tejedor M.T. 2015. *In silico* identification and three-dimensional modelling of the missense mutation in ADAMTS2 in a sheep flock with dermatosparaxis. Vet. Dermatol. 26:49-e16.
- Paciello O., Lamagna F., Lamagna B. & Papparella S. 2003. Ehlers-Danlos-Like Syndrome in 2 Dogs: Clinical, Histologic, and Ultrastructural Findings. Vet. Clin. Pathol. 32:13-18.
- Raineri C., Santos F.F. & Gameiro A.H. 2014. Ovinocultura de corte no Brasil: balanço de 2013 e perspectivas para 2014. Rev. Educ. Contin. Med. Vet. Zootec. CRMV-SP 12:12-17.
- Ramshaw J.A., Peters D.E., Jones L.N., Badman R.T. & Brodsky B.B. 1983. Ovine dermatosparaxis. Aust. Vet. J. 60:149-151.
- Silva A.P.C., Mol J.P.S., Carvalho Junior C.A., Paixão T.A. & Santos R.L. 2015. Dermatosparaxis in two White Dorper lambs in Brazil: case report. Arq. Bras. Med. Vet. Zootec. 67:741-746.
- Scott D.W. 2007. Color Atlas of Farm Animal Dermatology. Blackwell Publishing Professional, Ames.
- Sequeira J.L., Rocha N.S., Bandarra E.P., Figueiredo L.M.A. & Eugenio F.R. 1999. Collagen dysplasia (Cutaneous asthenia) in a cat. Vet. Pathol. 36:603-606.
- Sinke J.D., Van Dijk J.E. & Willemse T. 1997. A case of Ehlers-Danlos-like syndrome in a rabbit with a review of the disease in other species. Vet. Quart. 19:182-185.
- Sucupira M.C.A., Arcaute M.R., Lacasta D., Perez M.J., Ramos J.J., Verde M.T. & Ferrer L.M. 2009. Enfermedades Congénitas y Hereditarias de la Piel de los Corderos. I. Albéitar, Espanha, p.36-37.

- Vaatstra B.L., Halliday W.D. & Waropastrakul S. 2011. Dermatosparaxis in two White Dorper lambs. N. Z. Vet. J. 59:258-260.
- Van Halderen A. & Green J.R. 1988. Dermatosparaxis in White Dorper sheep. J. South Afr. Vet. Assoc. 59:45.
- Van Weeren-Keverling B.A. & Koeman J.P. 1986. A form of dermatosparaxis in a Texel lamb. Tijdschr. Diergeneeskde. 111:173-177.
- White S.D., Affolter V.K., Bannasch D.L., Schultheiss P.C., Hamar D.W., Chapman P.L., Naydan D., Spier S.J., Rosychuk R.A., Rees C., Veneklasen G.O., Martin A., Bevier D., Jackson H.A., Bettenay S., Matousek J., Campbell K.L. & Ihrke P.J. 2004. Hereditary equine regional dermal asthenia ("hyperelastosis cutis") in 50 horses: clinical, histological, immunohistological and ultrastructural findings. Vet. Dermatol. 15:207-217.
- Zhou H., Hickford J.G. & Fang Q. 2012. A premature stop codon in the ADAMTS2 gene is likely to be responsible for dermatosparaxis in Dorper sheep. Anim. Genet. 43:471-473.

LEGENDS OF FIGURES

Fig.1. Two White Dorper lamb with dermatosparaxis, showing (A) skin hyperextensibility in the chest area and (B) skin wound. (C,D) Skin wound and flap in affected lambs.

Fig.2. Number of sampled animals by region of Sao Paulo state, Brazil. Adapted from <<http://www.mapasparacolorir.com.br/>>

Fig. 1.

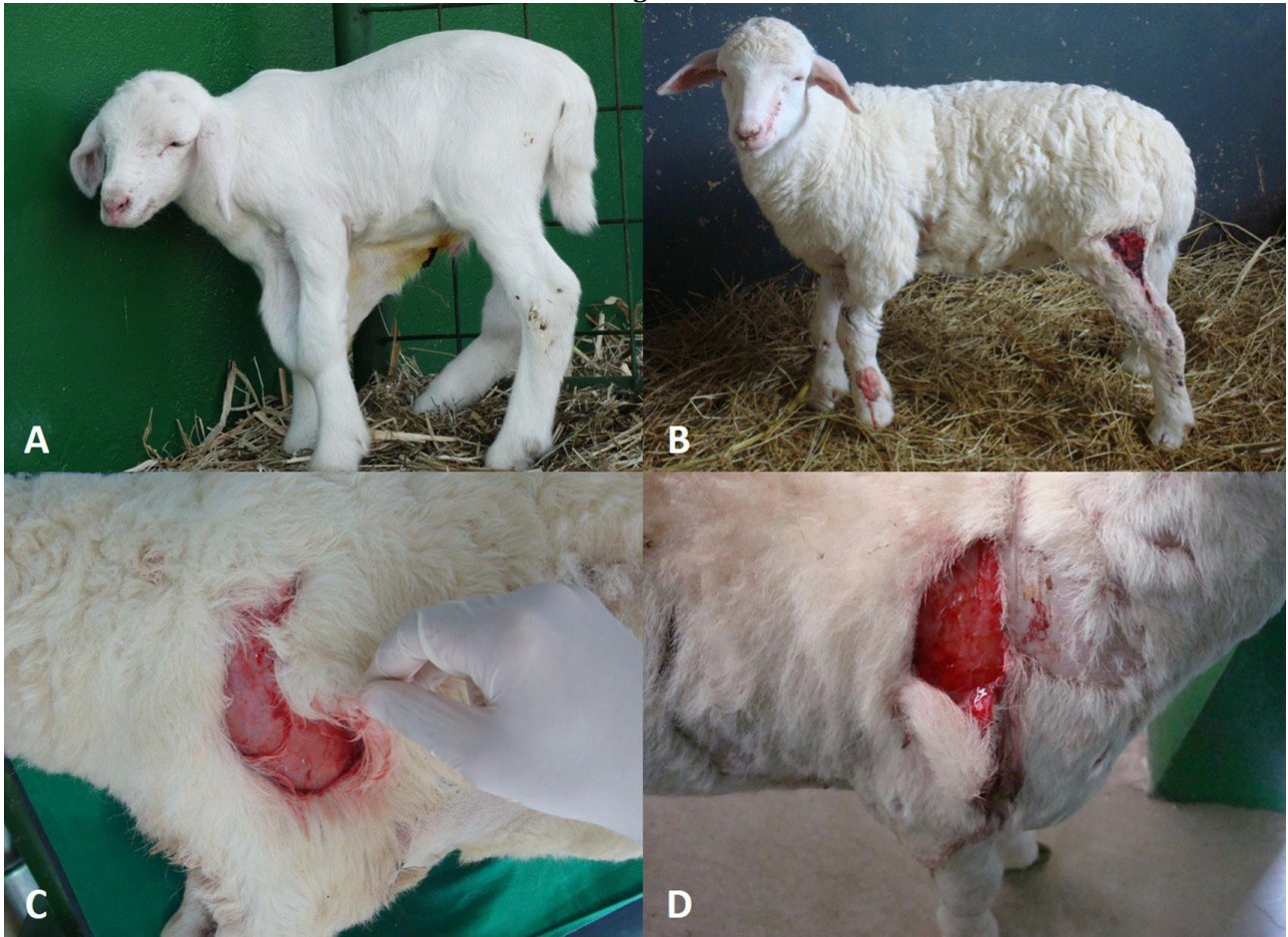


Fig. 2.

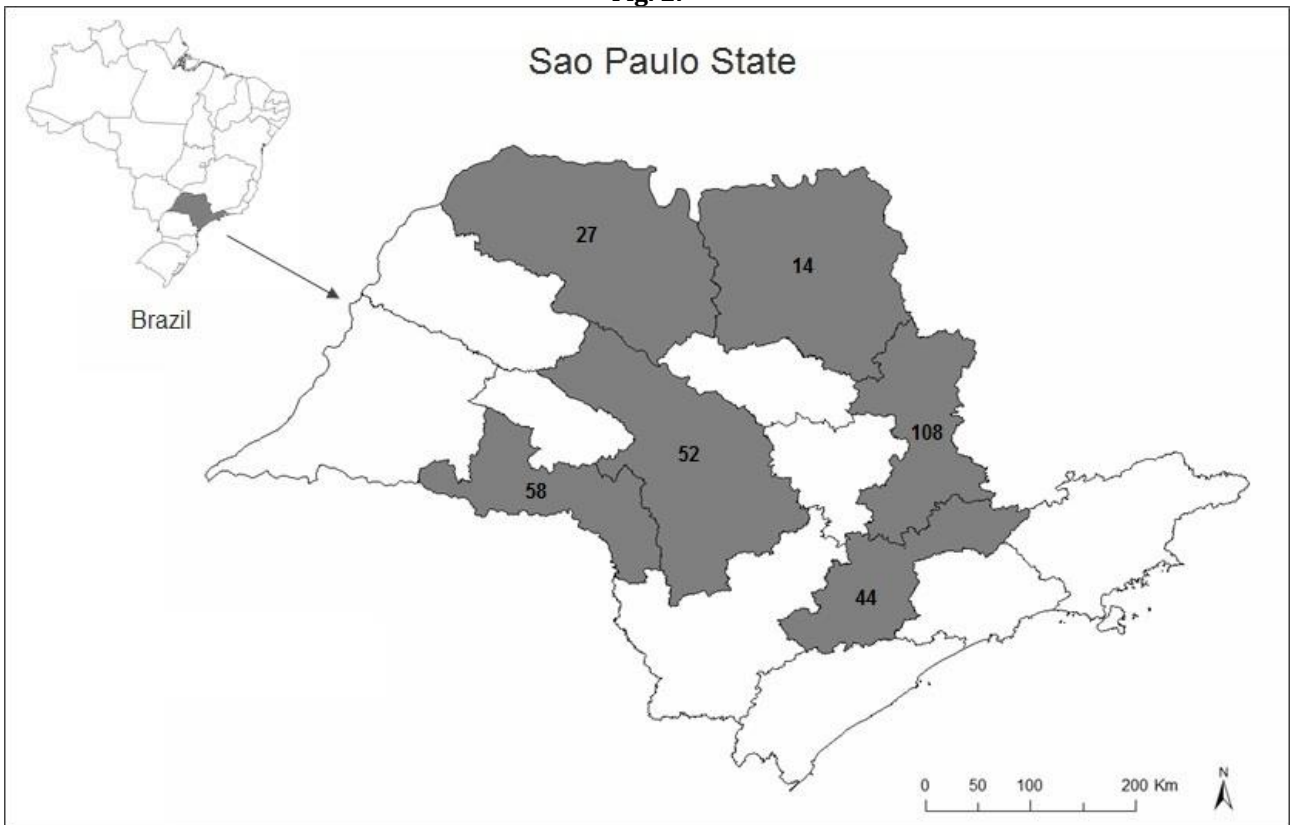


Table 1. Percentage of animal genotypes by farm.

	Wild Types (N/N)	Heterozygotes (A/N)	Sampling
Farm A	78.1%	21.9%	32
Farm B	78.6%	21.4%	14
Farm C	81.3%	18.7%	16
Farm D	100.0%	0.0%	23
Farm E	92.6%	7.4%	27
Farm F	81.8%	18.2%	44
Farm G	77.8%	22.2%	27
Farm H	61.5%	38.5%	13
Farm I	73.1%	26.9%	26
Farm J	90.0%	10.0%	40
Farm K	88.9%	11.1%	18
Farm L	100.0%	0.0%	23

Trabalho a ser enviado para a revista “Veterinária e Zootecnia”, cujas normas se encontram a seguir:

Diretrizes para Autores

- Artigos Científicos

Devem ser estruturados de acordo com os seguintes itens:

1. Página de rosto, com:

- Título do trabalho em português, em inglês e em espanhol, fonte Times New Roman, tamanho 12, com espaçamento simples, em negrito e centralizado, em letra maiúscula. Quando necessário, indicar a entidade financiadora da pesquisa, como primeira chamada de rodapé;
- Em caso de envolvimento de seres humanos ou animais de experimentação, encaminhar o parecer da Comissão de Ética ou equivalente, assinalando, no trabalho, antes das referências, a data de aprovação.

2. Página com resumo, abstract e resumen

- Tanto o resumo, como o abstract e o resumen devem ser seguidos do título do trabalho, no respectivo idioma, e conter no máximo 400 palavras cada um, com informações referentes à introdução, metodologia, resultados e conclusões. O texto deve ser justificado e digitado em parágrafo único e espaço simples, começando por RESUMO. O abstract, e o resumen devem ser tradução fiel do resumo. Independente da língua em que o artigo for apresentado, deverá conter o resumo em português, inglês e espanhol.
- Devem conter, no máximo, cinco palavras-chave, keywords, e palabras clave que identifiquem o conteúdo do texto.

3. A estrutura do artigo deverá conter:

Introdução: Deve ser clara, objetiva e relacionada ao problema investigado e à literatura pertinente, bem como aos objetivos da pesquisa. A introdução estabelece os objetivos do trabalho.

Material e Métodos: Deve oferecer informações de reprodutibilidade da pesquisa, de forma clara e concisa, como variáveis, população, amostra, equipamentos e métodos utilizados, inclusive os estatísticos.

Resultados: Apresentação dos resultados obtidos, que devem ser descritos sem interpretações e comparações. Poderá ser sob a **forma de tabelas**, no máximo de cinco, ordenadas em algarismos arábicos e encabeçadas pelo título, de acordo com as normas de apresentação tabular da ABNT/NBR 6023/2000 da Associação Brasileira de Normas Técnicas, identificadas no texto como Tabela; sob a **forma de figuras**, nos casos de gráficos, fotografias, desenhos, mapas, etc., ordenadas em algarismos arábicos, até no máximo de seis, e citadas no texto como Figura.

Discussão: Deve ser entendida como a interpretação dos resultados, confrontando com a literatura pertinente, apresentada na introdução. Se julgar conveniente, os resultados e a discussão poderão ser apresentados conjuntamente.

Conclusões: É a síntese final, fundamentada nos resultados e na discussão.

Referências: Devem ser apresentadas de acordo com as normas Vancouver (<http://www.icmje.org/>).

Deverão ser editorados em Microsoft Word for Windows, para edição de textos, Excel (qualquer versão) para gráficos, formato JPEG ou GIF (imagem) para fotografias, desenhos e mapas, formato A4 (21,0 x 29,7 cm), em espaço simples, mantendo margens de 2,5 cm, nas laterais, no topo e pé de cada página, fonte Times New Roman, tamanho 12 e numeração consecutiva das páginas em algarismos arábicos, a partir da folha de identificação. Deverão também apresentar numeração nas linhas, reiniciando a contagem a cada nova página. Ilustrações e legendas devem ser apresentadas no decorrer do texto. Não serão fornecidas separatas. Os artigos estarão disponíveis no formato PDF no endereço eletrônico da revista. Para as demais seções da revista são válidas as normas anteriores. Não devem exceder a 15 páginas. Abreviaturas não usuais devem ser empregadas após escritas por extenso na primeira utilização.

- **Artigos de Revisão Bibliográfica**

Os artigos de revisão bibliográfica serão publicados nas línguas portuguesa, inglesa e espanhola, quando o autor apresentar contribuição científica, relevante na área específica do assunto abordado, a convite dos editores.

Deverão conter: Título (português, inglês e espanhol), resumo com palavras-chave, abstract com keywords e resumen com palabras claves, introdução,

desenvolvimento do assunto, conclusão e referências. Deverão conter no máximo 20 páginas e 60 referências.

- **Relato de Caso**

Não devem ser estruturados, como os artigos. Devem apresentar o título em português, em inglês e espanhol, resumo com palavras-chave, abstract com keywords, resumen com palabras claves e referências. Devem conter no máximo cinco páginas, três tabelas ou figuras e 15 referências.

- **Comunicações Curtas**

São relatos contendo dados inéditos e relevantes de estudos originais, como, por exemplo, resultados preliminares de uma pesquisa. Devem ser apresentadas com, no máximo, cinco páginas, uma tabela e 10 referências. A estrutura deve respeitar as normas para relatos de caso.

- **Referências e Citações**

As referências devem ser numeradas consecutivamente e listadas na ordem em que são mencionadas no texto. As referências devem ser identificadas no texto, nas tabelas e legendas com números arábicos, entre parênteses, seguindo a mesma sequência. Os títulos das revistas devem ser abreviados de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus* disponível em: <http://www.nlm.nih.gov>.

Exemplos

Citações

O material deve ser mantido em compressas embebidas em solução fisiológica para evitar o ressecamento (5).

Aulisa(1) administrou heparina, por via intramuscular, em cobaias.

Udupa & Prasad (9) utilizaram osteoclasia manual do úmero sem imobilização.

Herbsman et al. (7) realizaram osteoclasia manual no fêmur e não imobilizaram.

O rato apresenta níveis mais elevados de heparina que o homem (35,42,51).

O mesmo autor obteve resultados semelhantes, mesmo com metodologias diferentes (22-26).

Referências

Indique somente até seis autores. Em caso de mais autores, usar et al. após o sexto autor.

1. Artigo de revista

Andrade SF, Sakate M. Intoxicação por amitraz: revisão. Vet Not. 2004;10:1-15.

Modolo JR, Stachissini AVM, Gennari SM, Dubey JP, Langoni H, Padovani CV, et al. Frequência de anticorpos anti-Neospora caninum em soros de caprinos do estado de São Paulo e sua relação com o manejo dos animais. Pesq Vet Bras. 2008;28:597-9.

2. Organização como autor

Association of Official Analytical Chemists. Official methods of analysis. 12nd ed. Washington; 1975.

Universidade Federal de Viçosa. SAEG: sistema de análises estatísticas e genéticas: manual do usuário: versão 7.1. Viçosa; 1997.

3. Livro

Modolo JR, Stachissini AVM, Castro RS, Ravazzolo AP. Planejamento de saúde para o controle da artrite-encefalite caprina. São Paulo: Cultura Acadêmica; 2003.

4. Capítulo de livro

Corrêa MC, Corrêa CNM. Estafilococias em geral. In: Corrêa MC, Corrêa CNM. Enfermidades infecciosas dos mamíferos domésticos. 2a ed. Rio de Janeiro: MEDSI, 1992. p.91-103.

Mendes AA, Saldanha ESPB. A cadeia produtiva da carne de aves no Brasil. In: Mendes AA, Naas IA, Macari M. Produção de frangos de corte. Campinas: FACTA, 2004. p.1-22

5. Artigos apresentados em congressos, reuniões, seminários etc

Malhado CHM, Piccinin A, Gimenez JN, Ramos AA, Gonçalves HC. Modelos polinomiais para descrever a curva de postura de codornas. In: Anais do 3º Congresso Nordestino de Produção Animal; 2004, Campina Grande. Campina Grande: Universidade Federal da Paraíba; 2004. p.1-3

6. Teses, dissertações e outros trabalhos acadêmicos

Mortari AC. Avaliação da técnica de transposição do músculo semitendinoso para reparo do diafragma pélvico: estudo experimental em

cães [dissertação]. Botucatu: Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista; 2004.

7. Publicações disponíveis na Internet

Vasconcelos JLM. Endometrite subclínica em vacas leiteiras. Campinas; 2004 [cited 2004 Jan 16]. Available from: .

**PRINCIPAIS DOENÇAS GENÉTICAS DE RUMINANTES ENCONTRADAS NO
BRASIL**

MAIN GENETIC DISEASES OF RUMINANTS IN BRAZIL

PRINCIPALES ENFERMEDADES GENÉTICAS DE LOS RUMIANTES EN BRASIL

PRINCIPAIS DOENÇAS GENÉTICAS DE RUMINANTES ENCONTRADAS NO BRASIL

RESUMO

Enfermidades de origem genética são observadas em diferentes espécies de ruminantes domésticos, entretanto o diagnóstico etiológico deste tipo de doença em muitas situações não é realizado por negligência ou completo desconhecimento da enfermidade pelo clínico ou pela falta de metodologia diagnóstica. O reconhecimento clínico, bem como, o diagnóstico etiológico da mutação responsável pela enfermidade, realizado sobretudo por testes moleculares, têm grande importância uma vez que medidas preventivas poderão ser adotadas visando a redução da ocorrência de novos casos e consequentemente a redução dos prejuízos financeiros. Dentre as enfermidades genéticas que acometem ruminantes destacam-se o albinismo oculocutâneo, a dermatosparaxia, a glicogenose generalizada, a microftalmia, a miotonia hereditária, o nanismo e a síndrome miastênica congênita. Com exceção da síndrome miastênica congênita, as demais enfermidades já foram descritas no Brasil, contudo poucos estudos de prevalência das mutações responsáveis por estas doenças foram realizados no país. Sendo assim, o objetivo deste estudo foi revisar as principais doenças genéticas diagnosticadas em ruminantes no Brasil para difundir o conhecimento dessas enfermidades e suas respectivas etiologias com o intuito de alertar sobre a possibilidade da disseminação dos genes indesejáveis nas populações brasileiras de bovinos, bubalinos e ovinos.

Palavras chave: anormalidades congênitas; bovinos; búfalos; doenças hereditárias; ovinos.

MAIN GENETIC DISEASES OF RUMINANTS IN BRAZIL

ABSTRACT

Genetic diseases are observed in different species of domestic ruminants, however the etiological diagnosis of this type of disorder is not carried out due to negligence or complete ignorance of the disease by the clinician or lack of diagnostic methodology. The clinical recognition and the etiological diagnosis of the mutation, carried out mainly by molecular tests, are important because preventive measures can be adopted to minimize significant economic losses and casualties of affected animals. Among the genetic diseases that affect ruminants, we cite oculocutaneous albinism, dermatosparaxis, generalised glycogenosis, microphthalmia, hereditary myotonia, dwarfism and congenital myasthenic syndrome. Except of congenital myasthenic syndrome, the other diseases have already been described in Brazil. However, few prevalence studies of mutations responsible for these diseases have been conducted in the country. Therefore, the objective of this study was review the main genetic diseases diagnosed in ruminants in Brazil to diffuse the knowledge of these diseases and their respective etiologies in order to alert the possibility of dissemination of undesirable genes in the Brazilian populations of cattle, buffaloes and sheep.

Keywords: buffaloes; cattle; congenital abnormalities; genetic diseases, inborn; sheep.

PRINCIPALES ENFERMEDADES GENÉTICAS DE LOS RUMIANTES EN BRASIL

RESUMEN

Las enfermedades genéticas se observan en diferentes especies de rumiantes domésticos, no obstante el diagnóstico etiológico de este tipo de trastorno no se lleva a cabo por negligencia o ignorancia completa de la enfermedad por el clínico o falta de metodología diagnóstica. El reconocimiento clínico y el diagnóstico etiológico de la mutación, principalmente por medio de pruebas moleculares, son importantes porque pueden adoptarse medidas preventivas para minimizar las pérdidas económicas significativas y las bajas de animales afectados. Entre las enfermedades genéticas que afectan a los rumiantes, citamos albinismo oculocutáneo, dermatosparaxis, glucogenosis generalizada, microftalmía, miotonía hereditaria, enanismo y síndrome miasténico congénito. Excepto el síndrome miasténico congénito, las otras enfermedades ya han sido descritas en Brasil. Sin embargo, pocos estudios de prevalencia de las mutaciones responsables de estas enfermedades se han realizado en el país. Por lo tanto, el objetivo de este estudio fue revisar las principales enfermedades genéticas diagnosticadas en rumiantes en Brasil para difundir el conocimiento de estas enfermedades y sus respectivas etiologías con el fin de alertar la posibilidad de diseminación de genes indeseables en las poblaciones brasileñas de bovinos, búfalos y ovinos.

Palabras clave: anomalías congénitas; bovinos; búfalos; enfermedades genéticas congénitas; ovinos.

INTRODUÇÃO

Na medicina veterinária, uma única mutação é esperada para a maioria das doenças genéticas. No entanto, em humanos, essas doenças são comumente causadas por mutações múltiplas, que ocasionam variações tanto na idade de apresentação quanto na evolução clínica da enfermidade. Além disso, também podem interferir no diagnóstico com base em ensaios enzimáticos. Esta heterogeneidade não é amplamente relatada nos animais, porque, em geral, as raças se desenvolveram em áreas geográficas localizadas, a partir de um número pequeno de animais fundadores e foram desenvolvidas por meio de programas de melhoramento controlados e baseados no pedigree. Devido a esses fatos, há uma menor diversidade genética nas raças animais (1), porém a incidência de uma determinada doença hereditária pode ser maior do que na maioria das populações humanas, já que há um maior grau de parentesco entre animais da mesma raça (2). Portanto, altos níveis de *inbreeding* estão associados à diminuição da variabilidade genética na população e ao aumento do aparecimento de enfermidades genéticas (3).

As variações genéticas, por meio de seus efeitos sobre a expressão do gene e função da proteína traduzida, constituem as bases das doenças genéticas em ruminantes. Essas variações estão na forma de polimorfismos de nucleotídeos únicos (SNPs); deleções ou inserções de nucleotídeos ou genes inteiros; ou rearranjos do cromossomo. Elas exercem diferentes graus de efeito sobre a ação do gene, tais como: substituição de um aminoácido por outro; interrupção prematura da tradução pela formação de um códon finalizador prematuro e eliminação de todo o éxon ou gene. Esses fatores influenciam a função do gene alterando/eliminando a função da proteína ou afetando o padrão de *splicing* do RNA mensageiro (4,5).

Algumas condições alertam para a possibilidade de uma doença apresentar caráter genético e hereditário: prevalência maior em um grupo de animais com elevado parentesco; aumento gradual no número de casos em um período de tempo ou aparecimento súbito da doença após introdução de um novo reprodutor; distribuição uniforme ao longo do ano e em diferentes localizações geográficas e a repetição de acasalamentos de um grupo produzir os mesmos resultados em uma mesma proporção numérica (6,7).

Apesar de os criadores se esforçarem para perpetuar somente as características desejáveis dos animais de seus rebanhos, a prática de seleção involuntariamente pode levar à ocorrência de características indesejáveis, como as enfermidades de origem genética (8). Animais de raça pura são mais comumente acometidos pelas doenças hereditárias, já que possuem uma base genética mais padronizada que animais mestiços, porém nestes, as enfermidades também podem ocorrer, entretanto com menor frequência (6).

Embora distúrbios semelhantes possam ser observados em diferentes raças de animais da mesma espécie, o seu modo de transmissão pode não ser o mesmo nessas raças. Isso acontece porque a capacidade de um gene mutante criar uma doença em um indivíduo depende do meio genético fornecido pelos outros genes expressados pelo animal. Esse fato explica também o porquê de algumas doenças genéticas apresentarem diferentes graus de gravidade nas diferentes raças. Outro fator que leva à variação na gravidade de uma doença genética em diferentes raças é que uma doença clinicamente semelhante pode ser ativada por genes mutantes diferentes (8).

Além do mais, a maioria das enfermidades genéticas nos animais domésticos e, sobretudo nos ruminantes, tende a apresentar herança autossômica recessiva, pois os genes mutantes dominantes em homozigose possuem propensão a letalidade, ou podem ser debilitantes, quando em indivíduos heterozigotos (8). Uma característica importante que dificulta o controle de doenças de caráter autossômico recessivo é o fato de que quando a mutação é finalmente caracterizada, o número de alelos recessivos distribuídos na população já deve ter atingido proporções elevadas. Comumente, muitos anos se passam entre a ocorrência de uma mutação e o aparecimento da doença (7). Portanto, a detecção dos animais heterozigotos (carreadores da mutação e clinicamente normais), que pode ser feito por análise da progênie, ensaios enzimáticos ou por técnicas moleculares, é de fundamental importância para o controle dessas enfermidades (6).

A implementação de programas de controle de doenças genéticas em animais, teoricamente, é simples, mas de prática complexa. Depende de investimentos em pesquisa e de elevados graus de confiança e cooperação entre criadores, pesquisadores, instituições e associações das raças envolvidas. Esses últimos órgãos têm papel fundamental, já que possuem capacidade para controlar registros de pedigree e, portanto, propiciam a realização de um melhor controle nos acasalamentos (1). Por fim, o controle genético das doenças dos animais pode reduzir os custos associados com doenças, melhorar o bem-estar animal e fornecer produtos animais saudáveis para os consumidores (4).

O objetivo deste estudo foi revisar as principais doenças genéticas diagnosticadas em ruminantes no Brasil, com foco nas suas etiologias, para alertar sobre a possibilidade da disseminação dos genes indesejáveis nas populações brasileiras de bovinos, bubalinos e ovinos.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

ALBINISMO OCULOCUTÂNEO

O albinismo oculocutâneo (OCA) é uma doença de caráter autossômico recessivo caracterizada por uma ausência parcial ou total de melanina nos cabelos, pele e olhos em humanos e animais (9). Em bubalinos, esta enfermidade é causada por uma substituição de uma única base (G→A) no nucleotídeo 1.431 do gene da tirosinase (*TYR*), o que leva a formação de um códon finalizador prematuro, resultando em uma proteína (tirosinase) inativa (9).

A tirosinase catalisa as duas primeiras etapas da biossíntese da melanina, isto é, a hidroxilação da tirosina em 3,4-di-hidroxifenilalanina (DOPA) e a oxidação da DOPA em dopaquinona (10, 11). Portanto, animais com esse SNP, em homozigose, tem um bloqueio na via metabólica que transforma a tirosina em melanina e, assim, apresentam as características clínicas do OCA: presença de pelos, extrato córneo dos chifres e cascos brancos; a pele e as

mucosas rosadas e manifestam sinais de fotofobia mantendo os olhos semifechados, principalmente, quando expostos à luz solar (9). A doença está associada, principalmente, aos búfalos da raça Murrah, em especial nos que tem origem búlgara, além de outras raças e mestiços (12). No Brasil há relatos nos estados do Pará e no Rio Grande do Sul (12).

Esta enfermidade provoca dificuldade no manejo e prejuízos econômicos provenientes dos tratamentos das possíveis lesões cutâneas e pela queda da produção de animais criados extensivamente, os quais diminuem a ingestão de alimentos por ficarem parte do tempo se protegendo da incidência do sol, particularmente em regiões tropicais como boa parte do Brasil. Embora o fenótipo de animal com OCA seja facilmente percebido, um animal heterozigoto para mutação, que é clinicamente normal, não será distinguido dos demais a não ser que testes moleculares sejam realizados. O conhecimento do genótipo destes animais é importante no momento dos acasalamentos para que a ocorrência de novos casos de OCA seja evitada.

DERMATOSPARAXIA

A dermatosparaxia apresenta herança autossômica recessiva e também é chamada de astenia cutânea ou cutis hiperelástica. Afeta o tecido conjuntivo e é caracterizada clinicamente pela extrema fragilidade e hiperextensibilidade da pele desde o nascimento (13). Denominada em humanos como síndrome de Ehlers-Danlos tipo VIIC (14), a dermatosparaxia já foi descrita em gatos (15), coelhos (16), cães (17), cavalos (18), bovinos (19), búfalos (20) e ovinos (21).

Especialmente na espécie ovina, a raça White Dorper possui o maior número de relatos da doença e em diversos países, como África do Sul (22), Austrália (23), Nova Zelândia (24, 25), Estados Unidos (26) e Brasil (27, 28). Em nosso país, animais clinicamente afetados já foram encontrados nos estados de São Paulo e de Minas Gerais (27, 28). Descobriu-se, também, que algumas linhagens de ovinos White Dorper importados da África do Sul e da Austrália introduziram o alelo com o SNP causador da doença no Brasil (29) e que sua frequência alélica é de 7,8% na população brasileira de ovinos White Dorper (30).

Assim como ocorre em humanos e em bovinos (14, 31) a dermatosparaxia, em ovinos White Dorper, é ocasionada por alterações no gene *ADAMTS2* (*a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin type I motif*, 2). A substituição de uma guanina por uma timina no nucleotídeo 421 da sequência codificante (c.421G>T) do gene *ADAMTS2* (éxon 2) leva à doença nos ovinos (25). Este SNP, quando em homozigose, é responsável pela formação de um códon finalizador prematuro, o qual leva à produção da enzima ADAMTS-2, confeccionada pelo gene *ADAMTS2*, truncada. Esse fato acarreta no processamento inadequado do pró-colágeno em colágeno (25) e, conseqüentemente, os animais manifestam os sinais clínicos da dermatosparaxia.

Recentemente, um SNP *missense*, ou seja, alteração de uma base que resulta na troca de um aminoácido por outro, foi identificado em homozigose no éxon 4 do gene *ADAMTS2*. Este SNP (g.1862883G>A) foi considerado causador da dermatosparaxia, também com herança autossômica recessiva, em um cordeiro de um rebanho de animais mestiços (32). Diferentemente do SNP descrito anteriormente (25), que produz um códon finalizador prematuro (*nonsense*), esse SNP foi capaz de substituir uma molécula de valina por uma de metionina, o que afetou o domínio catalítico da enzima ADAMTS-2 levando à alteração de sua estrutura e ao seu mal funcionamento (32).

Devido às feridas constantes e extensas, ocasionadas pela fragilidade cutânea, que podem levar a infecções, seps e morte dos cordeiros (21), os animais clinicamente afetados são impedidos de se manter no sistema de criação comercial e, portanto, são descartados ou retirados de suas atividades habituais.

GLICOGENOSE GENERALIZADA

A glicogenose generalizada tipo II conhecida também como doença de Pompe é uma enfermidade de caráter autossômico recessivo causada por duas mutações principais: E7 = deleção de uma timina e uma adenina no éxon 7 (c.1057ΔTA) e E13 = substituição de uma citosina por uma timina no éxon 13 (c.1783C>T) do gene que codifica a enzima α -glicosidase ácida (AAG). Essas duas mutações, de forma independente, acarretam na formação de códons finalizadores prematuros, que prejudicam a síntese normal dessa enzima e implicam na perda completa de sua função. Dessa forma, ocasionam o acúmulo lisossomal de glicogênio, pois este não é transformado em glicose e, conseqüentemente, ocorre seu acúmulo em todas as células do organismo, mas os efeitos são mais evidenciados nos músculos (33).

Existem descrições da enfermidade em humanos e em outras espécies animais, mas nos bovinos da raça Brahman, a doença apresenta caráter letal, pois os animais são descartados ou morrem antes do primeiro ano de vida (33). Os primeiros sinais clínicos são observados entre 2 e 3 meses de idade e são caracterizados inicialmente por retardo no crescimento, fraqueza muscular e hiperestesia. Com o tempo, evidenciam-se hipometria, tremores musculares, quedas constantes, dificuldade de se levantar e acompanhar a mãe (34; 33).

Embora a enfermidade já tenha sido diagnosticada no Brasil, em uma propriedade no Rio Grande do Sul (35), dados epidemiológicos sobre a incidência dos alelos mutados ainda são escassos no rebanho brasileiro de bovinos Brahman. Entretanto, sabe-se que a prevalência de animais heterozigotos para a mutação E7 é algo próximo a 6,3% em nosso país (36). Em países como a Austrália estima-se que os prejuízos anuais com perdas de animais acometidos pela doença aproximem-se a AUD\$ 1.284.000,00 (33). Em razão disso, a *Australian Brahman Breeders' Association Limited* exige que bovinos Brahman importados para reprodução ou sêmen sejam negativos para as mutações responsáveis pela glicogenose generalizada.

MICROFTALMIA

Microftalmia é uma enfermidade congênita e hereditária de caráter autossômico recessivo caracterizada clinicamente por olhos pequenos e cegueira total em neonatos, decorrente de anormalidades oculares no desenvolvimento do cristalino ainda durante a fase fetal (37, 38). Pode afetar várias espécies de mamíferos, inclusive os humanos. Na espécie ovina, acomete predominantemente a raça Texel (38, 39). Outras raças de ovelhas podem apresentar a doença, no entanto, não na forma hereditária (40). Nos ovinos Texel, a enfermidade é causada por uma substituição (G→C) no nucleotídeo 338 da sequência codificante (c.338G>C) do gene *Paired-Like Homeodomain 3 (PITX3)*, quando em homozigose (39).

A ocorrência de microftalmia e seu grau de disseminação não são conhecidos na população de ovinos Texel no Brasil, no entanto a doença foi encontrada em um rebanho no estado do Rio Grande do Sul, provavelmente relacionada à introdução de alguns ovinos heterozigotos (dados não publicados).

MIOTONIA HEREDITÁRIA

Essa enfermidade é caracterizada pelo atraso do relaxamento muscular após o fim da atividade motora voluntária ou após o fim de um estímulo elétrico ou mecânico. Os animais afetados apresentam rigidez muscular, movem-se lentamente e podem sofrer quedas, ficando, inclusive, em decúbito lateral (12). A doença, no Brasil, acomete principalmente os bubalinos da raça Murrah, em que apresenta caráter autossômico recessivo (41).

Esta forma de miotonia é causada por um processo defeituoso de *splicing* associado com a presença de um SNP sinônimo (c.396C>T) no gene *chloride voltage-gated channel 1 (CLCN1)*. O resultado deste *splicing* aberrante é a deleção dos últimos 43 nucleotídeos do éxon 3 do gene *CLCN1*, alteração na sua estrutura de leitura e também faz com que ocorra a terminação prematura da tradução pela formação de um códon finalizador prematuro. O gene *CLCN1* codifica o principal canal de cloreto presente nos músculos esqueléticos (CLC1) e suas

mutações diminuem a atividade do canal alterando a repolarização do sarcolema, o que gera a miotonia (41).

Primeiramente a enfermidade foi caracterizada como hiperplasia muscular similar a apresentada pelos bovinos com musculatura dupla (42), pois ocorre variação fenotípica nos búfalos. Alguns apresentam rigidez muscular, mas raramente caem ao solo, já outros caem após estímulo e apresentam-se rígidos (42, 12). Nos caprinos, os sinais clínicos são semelhantes, entretanto a miotomia hereditária que ocorre nesta espécie é determinada por um gene dominante (6).

NANISMO

O nanismo, que consiste no desenvolvimento anormal de um indivíduo, é determinado por genes que além de contribuir para uma pequena estatura, podem interferir negativamente em outros pontos importantes, como: saúde e reprodução (43). Há duas categorias morfológicas nesta enfermidade: nanismo proporcional e nanismo desproporcional. Dentro de cada uma destas, existem numerosos fenótipos que têm sido descritos em seres humanos e nos animais domésticos, como: cães, equinos, bovinos, ratos, galinhas e outras espécies (44). Causas dessa enfermidade podem envolver genes responsáveis pela produção, reconhecimento e metabolismo hormonal; por alterações na hipófise e/ou na tireoide e pelo desenvolvimento anormal das cartilagens e/ou da placa de crescimento ósseo (44).

Em bovinos, o nanismo desproporcional classifica-se com base em suas características morfológicas e possui apresentações fenotípicas variadas. Entretanto, todas possuem anormalidades na ossificação endocondral dos ossos longos, caracterizando-se como condrodisplasias. Existem os tipos *bulldog* (Dexter), *telemark*, *shorter* (braquicefálico) e cabeça alongada (dolicocefálico) (46). No Brasil, há relatos de animais apresentando os tipos *bulldog*, no gado Jersey (46) e *telemark*, nas raças Jersey, Shorthorn e bovino miniatura (46, 47).

O nanismo do tipo *bulldog* está associado com uma inserção de 4 pb na região codificante do gene do agrecano (ACAN). O agrecano é um grande proteoglicano de agregação da cartilagem e essencial para esta estrutura (44), portanto mutações neste proteoglicano são responsáveis por anormalidades no desenvolvimento ósseo. Esta doença possui dominância incompleta na raça Dexter, o que leva à formação de fenótipos intermediários em indivíduos heterozigotos, enquanto animais homozigotos recessivos exibem um nanismo desproporcional extremo e geralmente morrem durante a gestação (48, 49). Possivelmente esse tipo de condrodisplasia possui herança autossômica recessiva na raça Jersey (46) e clinicamente é caracterizada por cabeça grande e focinho curto; fenda palatina; protrusão da língua; encurtamento da coluna vertebral; herniação das vísceras abdominais e micromelia (46).

Já a condrodisplasia do tipo *telemark* possui herança autossômica recessiva, porém já foi associada à ingestão de pastagem ou silagem de trevo pelas matrizes da raça Hereford (50) ou à deficiência de manganês na dieta de bovinos das raças Murray Grey, Hereford e Angus (51). Caracteriza-se clinicamente por cabeça arredondada e de tamanho desproporcional; achatamento do focinho; fenda palatina; orelhas pequenas e encurtamento e rotação dos membros (46).

SÍNDROME MIASTÊNICA CONGÊNITA

Síndrome miastênica congênita (SMC), em bezerros da raça Brahman, apresenta herança autossômica recessiva e se caracteriza por fraqueza muscular progressiva e mortalidade no período neonatal (52). A deleção de 20 pb (470del20) no éxon 5 do gene *CHRNE* (*cholinergic receptor nicotinic epsilon subunit*) causa a substituição de 342 resíduos de aminoácidos da subunidade épsilon do receptor de acetilcolina (bov*CHRNE*) por 40 aminoácidos aberrantes incluindo um códon finalizador prematuro. Esta mutação resulta na produção de uma proteína não funcional na junção neuromuscular e leva aos sinais clínicos da

doença (53). No entanto, há evidências de que os animais heterozigotos têm maior peso vivo (PV) aos 600 dias de idade, e possivelmente, maior PV também ao nascimento, aos 200 dias e aos 400 dias, o que pode conferir uma vantagem seletiva e uma tendência de a frequência da mutação aumentar na população (54).

A prevalência de heterozigotos foi de 0,67% e 0,08% em bovinos Brahman registrados na África do Sul e Austrália, respectivamente, e tudo indica que a mutação foi introduzida nos rebanhos destes países por um Brahman americano ou por um dos seus ancestrais (52). Segundo a literatura consultada nenhum caso de SMC foi descrito no Brasil, contudo sabe-se que a prevalência de animais heterozigotos em nosso país aproxima-se de 0,79% (dados não publicados). Portanto, a evidência da doença pode ter sido negligenciada ou não diagnosticada, uma vez que os animais acometidos são submetidos à eutanásia com poucas semanas de vida e também pelo fato de o rebanho Brahman brasileiro ter sido formado principalmente por reprodutores oriundos dos EUA (55).

CONCLUSÃO

O conhecimento das mutações responsáveis pelas enfermidades de origem genética nos animais domésticos apresenta grande relevância no entendimento destas doenças, uma vez que o aparecimento de novos casos, independentemente da espécie, sempre acarretará prejuízos econômicos com a perda de animais na maioria dos casos. Em outras situações, a inexistência de medidas de controle pode se tornar um entrave comercial nacional e/ou internacional, impedindo a exportação de animais vivos destinados à reprodução e/ou sêmen para países que adotam medidas de controle de doenças de ordem genética. Além disso, geralmente, o padrão de herança das enfermidades genéticas em ruminantes é autossômico recessivo, o que contribui para ampliar a disseminação da enfermidade no plantel de forma silenciosa, uma vez que os animais que carregam os alelos mutantes não apresentam alteração clínica, somente seus descendentes quando na condição de homozigotos recessivos.

REFERÊNCIAS

1. Jolly RD. Screening for genetic diseases in cattle. *Aust Vet J.* 2002;80(5):284-285.
2. Jolly RD, Blair HT, Johnstone AC. Genetic disorders of sheep in New Zealand: A review and perspective. *N Z Vet J.* 2004;52(2):52-64.
3. Templeton AR. Population genetics and microevolutionary theory. Hoboken: Wiley-Liss; 2006.
4. Ibeagha-Awemu EM, Kgwatalala P, Ibeagha AE, Zhao X. A critical analysis of disease-associated DNA polymorphisms in the genes of cattle, goat, sheep, and pig. *Mamm Genome.* 2008;19:226-245.
5. Lühken G. Genetic testing for phenotype-causing variants in sheep and goats. *Mol Cell Probes.* 2012;26(6):231-237.
6. Radostits OM, Gay CC, Hinchcliff KW, Constable PD. *Veterinary Medicine: a textbook of the diseases of cattle, horses, sheep, pigs and goats.* 10^a ed. Edinburgh: W.B. Saunders; 2007.

- 1 7. Gentili A, Testoni S. Inherited disorders of cattle: a selected review. *Slov Vet Res.*
2 2006;43(1):17-29.
- 3
- 4 8. Basrur PK, Yadav B. Genetic diseases of sheep and goats. *Vet Clin North Am Food Anim*
5 *Pract.* 1990;6(3):779-802.
- 6
- 7 9. Damé MCF, Xavier GM, Oliveira-Filho JP, Borges AS, Oliveira HN, Riet-Correa F, et al. A
8 nonsense mutation in the tyrosinase gene causes albinism in water buffalo. *BMC Genet.*
9 2012;13:62.
- 10
- 11 10. Lerner AB, Fitzpatrick TB, Calkins E, Summerson WH. Mammalian tyrosinase:
12 preparation and properties. *J Biol Chem.* 1949;178:185-195.
- 13
- 14 11. Carden SM, Boissy RE, Schoettker PJ, Good WV. Albinism: modern molecular diagnosis.
15 *Brit J Ophthalmol.* 1998;82:189-195.
- 16
- 17 12. Damé MCF, Riet-Correa F, Schild AL. Doenças hereditárias e defeitos congênitos
18 diagnosticados em búfalos (*Bubalus bubalis*) no Brasil. *Pesq Vet Bras.* 2013;33(7):831-839.
- 19
- 20 13. Scott DW. *Color Atlas of Farm Animal Dermatology.* Ames: Blackwell Publishing
21 Professional, 2007.
- 22
- 23 14. Colige A, Sieron AL, Li SW, Schwarze U, Petty E, Wertelecki W, et al. Human Ehlers-
24 Danlos syndrome type VII C and bovine dermatosparaxis are caused by mutations in the
25 procollagen I N-proteinase gene. *Am J Hum Genet.* 1999;65:308-317.
- 26
- 27 15. Counts DF, Byers PH, Holbrook KA, Hegreberg GA. Dermatosparaxis in a Himalayan cat:
28 I. Biochemical studies of dermal collagen. *J Invest Dermatol.* 1980;74:96-99.
- 29
- 30 16. Sinke JD, van Dijk JE, Willemse T. A case of Ehlers-Danlos-like syndrome in a rabbit with
31 a review of the disease in other species. *Vet Quart.* 1997;19:182-185.
- 32
- 33 17. Paciello O, Lamagna F, Lamagna B, Papparella S. Ehlers-Danlos–Like Syndrome in 2
34 Dogs: Clinical, Histologic, and Ultrastructural Findings. *Vet Clin Pathol.* 2003;32:13-18.
- 35
- 36 18. White SD, Affolter VK, Bannasch DL, Schultheiss PC, Hamar DW, Chapman PL, et al.
37 Hereditary equine regional dermal asthenia (“hyperelastosis cutis”) in 50 horses: clinical,
38 histological, immunohistological and ultrastructural findings. *Vet Dermatol.* 2004;15:207-217.
- 39
- 40 19. Kawaguchi T, Fukazawa H, Naito Y, Okada K. Dermal dysplasia characterized by collagen
41 disorder-related skin fragility in a cow. *Am J Vet Res.* 1988;49:965-971.
- 42
- 43 20. Lau HD. Dermatosparaxis in buffalo: a case report. *Buffalo Bull.* 1997;16(2):46.
- 44
- 45 21. Fjølstad M, Helle O. A hereditary dysplasia of collagen tissues in sheep. *J Pathol.*
46 1974;112:183-188.
- 47
- 48 22. van Halderen A, Green JR. Dermatosparaxis in White Dorper sheep. *J South Afr Vet Assoc.*
49 1988;59:45.
- 50

23. Aggs R. Screen test for fragile skin. *Agriculture Today*. 2007. Disponível em <http://www.dpi.nsw.gov.au/archive/agriculture-today-stories/ag-today-archives/august-2007/fragile-skin> Acesso em 17 de julho de 2015.
24. Vaatstra BL, Halliday WD, Waropastrakul S. Dermatosparaxis in two White Dorper lambs. *N Z Vet J*. 2011;59:258-260.
25. Zhou H, Hickford JG, Fang Q. A premature stop codon in the ADAMTS2 gene is likely to be responsible for dermatosparaxis in Dorper sheep. *Anim Genet*. 2012;43:471-473.
26. Grant D, Patton W. Dermatosparaxis in White Dorpers. 2012. Disponível em http://www.dorper.org/PDF_SALE/DERMATOSPARAXIS.pdf Acesso em 3 de março de 2014.
27. Andrade DGA, Pavan LF, Amorim RM, Chiacchio SB, Laufer-Amorim R, Gonçalves RC, et al. Aspectos clínicos, histopatológicos e moleculares da dermatosparaxia em ovinos White Dorper. *Pesq Vet Bras*. 2014;34:442-448.
28. Silva APC, Mol JPS, Carvalho Junior CA, Paixão TA, Santos RL. Dermatosparaxis in two White Dorper lambs in Brazil: case report. *Arq Bras Med Vet Zootec*. 2015;67:741-746.
29. Gouveia JJS, Cunha SMF, Almeida EM, Nogueira JF, Souza Filho JLP, Menezes DR, et al. Molecular and genealogical analyses reveal multiple sources of the mutation associated with dermatosparaxis in Brazilian White Dorper sheep. *Small Rumin Res*. 2016;140:46-49.
30. Andrade DGA, Dalanezi FM, Trecenti AS, Cunha PHJ, Borges AS, Oliveira-Filho JP. Prevalence study of SNP c.421G>T in the ADAMTS2 gene responsible for dermatosparaxis in White Dorper sheep in Brazil. *Pesq Vet Bras*. 2016;36(2):73-76.
31. Colige A, Nuytinck L, Hausser I, van Essen AJ, Thiry M, Herens C, et al. Novel types of mutation responsible for the dermatosparactic type of Ehlers-Danlos syndrome (Type VIIC) and common polymorphisms in the ADAMTS2 gene. *J Invest Dermatol*. 2004;123(4):656-663.
32. Monteagudo LV, Ferrer LM, Catalan-Insa E, Savva D, McGuffin LJ, Tejedor MT. In silico identification and three-dimensional modelling of the missense mutation in ADAMTS2 in a sheep flock with dermatosparaxis. *Vet Dermatol*. 2015;26:49-e16.
33. Dennis JA, Healy PJ, Reichmann KG. Genotyping Brahman cattle for generalised glycogenosis. *Aust Vet J*. 2002;80(5):286-291.
34. O'Sullivan BM, Healy PJ, Fraser IR, Nieper RE, Whittle RJ, Sewell CA. Generalised glycogenosis in Brahman cattle. *Aust Vet J*. 1981;57(5):227-229.
35. Zlotowski P, Nakazato L, Dutra V, Barros SS, Gimeno EJ, Göcks M, et al. Glicogenose hereditária em bovinos Brahman no Brasil. *Pesq Vet Bras*. 2005;25(4):210-214.
36. Trecenti AS, Andrade DGA, Fernandes AV, Oliveira AP, Oliveira-Filho JP. Estudo das mutações responsáveis pela glicogenose generalizada em bovinos da raça Brahman - resultados preliminares. In: *Anais do II Simpósio de Enfermidades Clínicas em Ruminantes*; 2016, Botucatu.

37. van der Linde-Sipman JS, van den Ingh TSGAM, Vellema P. Morphology and morphogenesis of hereditary microphthalmia in Texel sheep. *J Comp Path.* 2003;128:269-275.
38. Tetens J, Ganter M, Müller G, Drögemüller C. Linkage mapping of ovine microphthalmia to chromosome 23, the sheep orthologue of human chromosome. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2007;48:3506-3515.
39. Becker D, Tetens J, Brunner A, Bürstel D, Ganter M, Kijas J, et al. Microphthalmia in Texel sheep is associated with a missense mutation in the paired-like homeodomain 3 (PITX3) gene. *PLoS One.* 2010;5(1):e8689.
40. Dantas AFM, Riet-Correa F, Medeiros RMT, Galiza GJN, Pimentel LA, Anjos BL, et al. Malformações congênitas em ruminantes no semiárido do Nordeste Brasileiro. *Pesq Vet Bras.* 2010;30:807-815.
41. Borges AS, Barbosa JD, Resende LAL, Mota LSLS, Amorim RM, Carvalho TL, et al. Clinical and molecular study of a new form of hereditary myotonia in Murrah water buffalo. *Neurom Disord.* 2013;23:206–213.
42. Barbosa JD, Tury E, Barbosa IBP, Dias VRC. Hiperplasia muscular congênita (Doppellender, Double Muscling, Culard) em búfalos no Estado do Pará, Brasil. *Ciênc Vet Trop.* 1999;2:50-52.
43. Eberth J, Swerczak T, Bailey E. Investigation of Dwarfism Among Miniature Horses using the Illumina Horse SNP50 Bead Chip. *J Equine Vet Sci.* 2009;29(5):315.
44. Eberth JE. Chondrodysplasia-Like Dwarfism in the Miniature Horse [dissertação]. Lexington: College of Agriculture, University of Kentucky; 2013.
45. Thompson K. Bones and joints. In: Maxie MG (Ed.). *Jubb, Kennedy, and Palmer's Pathology of Domestic Animals.* 5^a ed. Philadelphia: Saunders Elsevier, 2007. p.1-184.
46. Coelho ACB, Marcolongo-Pereira C, Soares MP, Quevedo PS, Riet-Correa F, Schild AL. Condrodisplasia em bovinos no Sul do Rio Grande do Sul. *Pesq Vet Bras.* 2013;33(10):1195-1200.
47. Machado GAC, Silva DN, Fontes TN, Requião JGT, Requião KG, Madureira KM, et al. Condrodisplasia tipo telemark em bovino miniatura - Relato de caso. *Rev Bras Med Vet.* 2016;38(Supl.1):70-74.
48. Cavanagh JAL, Tammen I, Windsor PA, Bateman JF, Savarirayan R, Nicholas FW, et al. Bulldog dwarfism in Dexter cattle is caused by mutations in ACAN. *Mamm Genome.* 2007;18:808-814.
49. Murgiano L, Jagannathan V, Benazzi C, Bolcato M, Brunetti B, Muscatello LV, et al. Deletion in the EVC2 Gene Causes Chondrodysplastic Dwarfism in Tyrolean Grey Cattle. *PLoS One.* 2013;9(4):e94861.
50. Ribble CS, Janzen ED, Proulx JG. Congenital joint laxity and dwarfism: A feed-associated congenital anomaly of beef calves in Canada. *Can Vet J.* 1989;30:331-338.

- 1
2 51. McLaren PJ, Cave JG, Parker EM, Slocombe RF. Chondrodysplastic calves in Northeast
3 Victoria. Vet Pathol. 2007;42:342-354.
4
5 52. Thompson PN, Dennis JA, Mercieca KN, Harper CK, Nel A, Bell E, et al. Screening for
6 two genetic diseases affecting calf survival in South African and Australian Brahman cattle. In:
7 Proceedings of the 10th International Symposium on Veterinary Epidemiology and Economics;
8 2003, Viña del Mar. p.358.
9
10 53. Kraner S, Sieb JP, Thompson PN, Steinlein OK. Congenital myasthenia in Brahman calves
11 caused by homozygosity for a *CHRNE* truncating mutation. Neurogenetics. 2002;4:87–91.
12
13 54. Thompson PN, van der Werf JHJ, Heesterbeek JAP, van Arendonk JAM. The *CHRNE*
14 470del20 mutation causing congenital myasthenic syndrome in South African Brahman cattle:
15 Prevalence, origin, and association with performance traits. J Anim Sci. 2007;85:604–609.
16
17 55. Associação dos Criadores de Brahman do Brasil. A História da Raça Brahman. Disponível
18 em <<http://www.brahman.com.br/index.php/raca-brahman/a-historia-da-raca-brahman.html>>
19 Acesso em 17 de dezembro de 2016.

ANEXO 1

(Termo de Consentimento Livre e Esclarecido)

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Declaro para os devidos fins que estou ciente e autorizo a realização do procedimento **coleta de sangue por punção da veia jugular**, referente ao Projeto de Pesquisa intitulado **“FREQUÊNCIA ALÉLICA DO POLIMORFISMO DE NUCLEOTÍDEO ÚNICO c.421G>T NO GENE ADAMTS2, RESPONSÁVEL PELA DERMATOSPARAXIA EM OVINOS WHITE DORPER”**, de responsabilidade do Prof. José Paes de Oliveira Filho.

Nome do animal / propriedade (rebanho): _____

Nome do Responsável: _____

RG: _____

Data: / / 20____

Assinatura: _____

FMVZ/UNESP – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
DEPARTAMENTO DE CLÍNICA VETERINÁRIA

Distrito de Rubião Jr., s/n – Cxa. Postal 560 – Botucatu/SP – 18618-000
☎/fax: 14-3811-6067 – ✉ dcvet@fmvz.unesp.br – 🌐 www.fmvz.unesp.br