

# RESSALVA

Atendendo solicitação do(a)  
autor(a), o texto completo desta tese  
será disponibilizado somente a partir  
de 10/07/2020.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

ESTUDO DA MIOTONIA HEREDITÁRIA EM  
SUÍNOS

CÉSAR ERINEUDO TAVARES DE ARAÚJO

BOTUCATU - SP  
JULHO DE 2018

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

ESTUDO DA MIOTONIA HEREDITÁRIA EM  
SUÍNOS

CÉSAR ERINEUDO TAVARES DE ARAÚJO

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

Orientador: Prof. Dr. Alexandre  
Secorun Borges.

Co-orientador: Prof. Dr. José  
Paes de Oliveira Filho.

BOTUCATU - SP  
JULHO DE 2017

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

Araújo, César Erineudo Tavares de.

Estudo da miotonia hereditária em suínos / César Erineudo Tavares de Araújo. - Botucatu, 2018

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

Orientador: Alexandre Secorun Borges

Coorientador: José Paes de Oliveira Filho

Capes: 50501003

1. Músculos - Doenças. 2. Miotonia. 3. Canalopatias. 4. Doenças hereditárias. 5. Deleção de genes. 6. Suíno.

Palavras-chave: Canal de cloro; Canalopatia; Deleção; Doença hereditária; Doença muscular.

Nome do autor: César Erineudo Tavares de Araújo

Título: ESTUDO DA MIOTONIA HEREDITÁRIA EM SUÍNOS

### **COMISSÃO EXAMINADORA**

Prof. Dr. Alexandre Secorun Borges

Presidente e Orientador

Departamento de Clínica Veterinária

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia- FMVZ

UNESP - Botucatu -SP

Prof. Dr. João Pessoa Araújo Júnior

Membro

Departamento de Microbiologia e Imunologia

Instituto de Biociências de Botucatu - UNESP - Botucatu - SP

Prof. Dr. Diego José Zanzarini Delfiol

Membro

Faculdade de Medicina Veterinária da UFU- FAMEV

Universidade Federal de Uberlândia - Uberlândia - MG

Dr. Peres Ramos Badial

Membro

Department of Pathobiology and Population Medicine

College of Veterinary Medicine, Mississippi State University,

Starkville, MS, USA.

Prof. Dr. José Diomedes Barbosa Neto

Membro

Departamento de Ciência Animal

Instituto de Medicina Veterinária - Universidade Federal do Pará -

Campus Castanhal - Castanhal - PA

Data da defesa: 10 de Julho de 2018

*DEDICO ESSE TRABALHO À MINHA FAMÍLIA*

*Aos meus pais, LUIZ JOSÉ DE ARAÚJO e MARIA LÚCIA TAVARES, compreensivos de minha ausência, fortalecedores de minhas fraquezas, amor eterno.*

*Ao meu irmão, MOISÉS EDERLÂNIO TAVARES DE ARAÚJO, companheiro de vida e incentivador de meus sonhos.*

*À minha irmã, ROSA EDILÉIA TAVARES DE ARAÚJO (in memoriam).*

## **AGRADECIMENTOS**

*À família, alicerce de tudo. Meu porto seguro, o que seria de mim sem vocês?*

*Carolina Tiemi Cardoso Okada, minha namorada, obrigado pelo amor. Companheira especial que tornou meus dias mais felizes e deu mais sentido à decisão de Botucatu fazer parte de minha vida, tornando-se parte dela.*

*Ao Professor Dr. Alexandre Secorun Borges, mais que um orientador, um amigo. Exemplo profissional, obrigado por confiar-me esse projeto, pelos incentivos e apoios. Me ajudou a perceber que sou mais capaz do que pensei.*

*Ao meu coorientador professor Dr. José Paes de Oliveira Filho, pela confiança, colaboração diária e ensinamentos imprescindíveis.*

*Ao Professor Dr. João Pessoa de Araújo Júnior, pelo apoio, ensinamentos, disponibilidade e prontidão em ajudar.*

*Agradeço à UFPA, especialmente aos professores Dr. José Diomedes Barbosa Neto e Carlos Magno Chaves Oliveira, pelos quais possuo profunda admiração, pela fundamental colaboração na idealização e realização desta pesquisa.*

*Agradeço aos médicos veterinários e residentes da UFPA em nome do médico veterinário Dr. José Alcides Sarmiento da Silveira pelo acolhimento e colaboração nas etapas de coleta.*

*Ao professor Dr. Luiz Antônio de Lima Resende pela disponibilidade em se deslocar para a UFPA e colaborar na realização do exame de EMG.*

*Aos amigos, Ana Luiza Holanda de Albuquerque, Anelize de Souza Trecenti, Campo Amor Vieira da Cunha Neto, Danilo Giorgi Abranches Andrade, Daiane Rodrigues, Didier Quevedo Cagnini, Diego José Zanzarini Delfiol, Giovane Olivo, Juliana Mira, Juliana Nogueira da Gama, Larissa Rocha Andrade, Luiza Stachewski Zakia, Mariana Herman, Mariana Isa Poci Palumbo, Natália Moraes Dias, Natália Lourenço e Peres Ramos Badial e Raissa Leite com os quais convivi na inesquecível "salinha". Obrigado pela amizade e contribuições durante todos esses anos, tem sido um privilégio conviver com todos vocês.*

*Ao LDM, em especial agradeço a Msc. Camila Dantas Malossi e a Dra. Leila Sabrina Ullmann pela amizade e colaboração no processamento das reações de NGS.*

*Às secretárias do Departamento de Clínica Veterinária, Marlene Dias de Camargo e Izabel Cristina Castro e aos funcionários da Clínica de Grandes Animais Cesar Leme e Marco Antônio Simão pela colaboração durante o curso de pós-graduação.*

*Aos Médicos Veterinários Residentes e aos funcionários da Clínica de Grandes Animais da FMVZ/ UNESP/ Botucatu pela amizade e ajuda nas atividades de pesquisa do grupo.*

*Ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, em nome do funcionário Carlos Pazini Junior e À Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – Unesp - Botucatu, pelo apoio da instituição para o desenvolvimento desta dissertação.*

*A Fundação de Apoio à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP pelo auxílio financeiro concedido para realização desta pesquisa e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior(CAPES) pela concessão de bolsa de Doutorado.*

*Aos amigos de infância, em nome de Lucas Moreira Alves, que sempre me apoiaram e me incentivaram para ingressar na pós-graduação stricto sensu.*

*Aos animais, motivo de minha profissão, especialmente os cavalos que despertam em mim profunda admiração e curiosidade.*

## Senhor fazei de mim um instrumento de vossa paz

La Clochette - 1912

“And still we could never suppose that fortune were to be so friend to us, such as to allow us to be perhaps the first in handling, as it were, the electricity concealed in nerves, in extracting it from nerves, and, in some way, in putting it under everyone’s eyes”

**LUIGI GALVANI**

*De virtibus electricitatis in motu musculari commentarius (1790)*

“and all sensation is excited, and the members of animal bodies move at the command of the will, namely, by the vibrations of this spirit, mutually propagated along the solid filaments of the nerves, from the outward organs of sense to the brain and from the brain into the muscles. But these are things that cannot be explained in few words nor are we furnished with that sufficiency of experiments which is required to an accurate determination and demonstration of the laws by which this electric and elastic spirit operates”

**Isaac Newton**

*The Mathematical principles of natural philosophy (1729)*

“Question authority. No idea is true just because someone says so, including me.

Think for yourself.

Question yourself. Don’t believe anything just because you want to.

Believing something doesn’t make it so.

Test ideas, by the evidence gained from observation and experiment.

If a favorite idea fails a well designed test, it’s wrong.

Get over it.

Follow the evidence, wherever it leads. If you have no evidence,

reserve judgment.

And perhaps even the most important rule of all: remember

you could be wrong”

Neil deGrasse Tyson (2014)

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1: Variantes de transcritos do <i>CLCN-1</i> e isoformas do <i>CLC-1</i> humano.....	31
TABELA 2: Variantes de transcritos do <i>CLCN-1</i> e isoformas do <i>CLC-1</i> suíno.....	31
TABELA 3: Principais enfermidades musculares miotônicas hereditárias e respectivas características quanto ao padrão de herança, gene afetado, tipo de miotonia, presença de fraqueza muscular, fator desencadeante e características adicionais.....	37
TABELA 4: Relação dos 28 animais utilizados na pesquisa.....	54
TABELA 5 - Relação de primers desenhados ao longo da sequência referência X1 (XM_021078561.1).do RNAm do gene <i>CLCN1</i> suíno.....	58
TABELA 6: Relação de oligonucleotídeos desenhados com o objetivo de amplificar o segmento entre os íntrons 14 e 16 do gene <i>CLCN1</i> suíno.....	62
TABELA 7: Relação dos primers utilizados no desenvolvimento do teste molecular para diagnóstico e genotipagem de miotonia hereditária em suínos.....	64
TABELA 8: Produtos resultantes do teste de genotipagem em relação a deleção causadora de miotonia hereditária em suínos.....	64
TABELA 9: Relação de produtos e respectivos <i>primers</i> utilizados nas reações de RTq-PCR.....	66
TABELA 10: Identificação das sequências utilizadas para alinhamento da proteína <i>CLC1</i> de 14 espécies de mamíferos.....	67
TABELA 11: Classificação da intensidade dos principais sinais clínicos verificados nos suínos afetados por miotonia hereditária.....	75
TABELA 12: Valores absolutos e médias obtidas e nos exames de bioquímica sérica de 4 animais afetados (A-D).....	75
TABELA 13: Resultados do alinhamento das sequências homólogas para a sequência de RNAm transcrito alternativo X2 de suínos (XM_021078562.1).....	77
TABELA 14: Polimorfismos existentes nas sequências de cDNA referentes ao gene <i>CLCN1</i> suíno, obtidas de animais miotônicos e <i>wild types</i> , comparadas a sequência referência variante X1 (XM_021078561.1).....	78
TABELA 15: Polimorfismos, inserção e deleção encontrados nas sequências de DNA dos animais afetados em relação à sequência genômica de referência para o gene <i>CLCN1</i> suíno (NC_010460.4).....	83
TABELA 16: Composição da deleção verificada nas sequências de DNA dos animais afetados em comparação com a sequência referência do gene <i>CLCN1</i> suíno (NC_010460.4).....	84
TABELA 17: Resultado do teste diagnóstico (Genótipo) pra os 26 animais avaliados. ....	86
TABELA 18: Média e desvio padrão para os valores de CT e $\Delta$ CT referentes ao produto P8 considerando B actina como <i>housekeeping</i> .....	87
TABELA 19: Média e desvio padrão para os valores de CT e $\Delta$ CT referentes ao produto P15-16 considerando B actina como <i>housekeeping</i> .....	88
TABELA 20: Valores de $2^{-\Delta\Delta CT}$ para os produtos P8 e P15-16, comparados entre os animais <i>wild types</i> , heterozigotos e homozigotos recessivos.....	88
TABELA 21: Média e desvio padrão para os valores de CT e $\Delta$ CT referentes ao produto P14/17 considerando B actina como <i>housekeeping</i> .....	89
TABELA 22: Valores de $2^{-\Delta\Delta CT}$ para o produto P14/17, comparados entre os animais <i>wild types</i> , heterozigotos e homozigotos recessivos.....	89
TABELA 23: Diferenças observadas na sequência inferida da proteína <i>CLC1</i> dos animais recessivos miotônicos, comparadas as sequências: inferida dos animais <i>wild types</i> , sequência referência isoforma X1 e referência isoforma X2.....	91
TABELA 24: Relação das estruturas obtidas por homologia com os modelos 5TQQ, 3ORG e 1KPL, e respectivos valores de qualidade para o programa Modeller®....	99
TABELA 25: Relação das estruturas obtidas por homologia com os modelos 5TQQ, 3ORG e 1KPL, e respectivos valores de qualidade para o software Swiss-Model®. ....	99

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1: Esquema demonstrando a organização espacial dos principais canais iônicos presentes na junção neuromuscular. Fonte: adaptado de Karpati et al (2009).....	21
FIGURA 2: Dendrograma das proteínas <i>CLC</i> humanas. O comprimento das linhas e a distância entre os ramos, significam a similaridade entre os membros da família <i>CLC</i> , calculada pelo algoritmo ClustalW. Fonte: Adaptado de Zifarelli e Pusch (2015).....	24
FIGURA 3: Representação esquemática bidimensional de um monômero /subunidade do cotransportador <i>CLC</i> de eucarioto- <i>CmCLC</i> (FENG et al., 2010). Fonte: Adaptado de Bretag e Ma (2015).....	26
FIGURA 4 - Estrutura cristalográfica do canal (A) <i>EcCLC</i> de <i>Escherichia coli</i> ( <i>Protein data bank</i> - 1KPK); e (B) <i>CmCLC</i> de <i>Cyanidioschyzon merolae</i> ( <i>Protein Data Bank</i> - 3ORG). Fonte: Adaptado de Zifarelli e Pusch (2015).....	27
FIGURA 5: Estrutura do canal <i>BtCLC-K</i> (em cinza e magenta) sobreposta a estrutura de uma subunidade do canal <i>CmCLC</i> (em ciano) demonstrando alta similaridade. Fonte: Adaptado de Park <i>et al.</i> 2017.....	28
FIGURA 6: Gráfico de distribuição das superfamílias de proteínas existentes no banco de dados CATH, em função da diversidade estrutural e da diversidade de seqüências. Fonte: Adaptado de CATH 2017 (disponível em <a href="http://www.cathdb.info/version/v4_1_0/superfamily/1.10.3080.10">http://www.cathdb.info/version/v4_1_0/superfamily/1.10.3080.10</a> ).....	28
FIGURA 7: Poro seletivo de Cl <sup>-</sup> para o canal <i>EcCLC</i> (A), o cotransportador <i>CmCLC</i> (B) e o canal <i>BtCLCK</i> (C). Fonte: Adaptado de Park <i>et al.</i> (2017).....	30
FIGURA 8: Fluxograma hierárquico, demonstrando um algoritmo que pode ser empregado para o diagnóstico das enfermidades miotônicas primárias, considerando características clínicas, EMG, histopatológicas e moleculares. Fonte: adaptado de Fontaine e Hanna (2010).....	42
FIGURA 9: Representação esquemática bidimensional de um monômero/subunidade do cotransportador <i>CLC</i> de eucarioto- <i>CmCLC</i> (FENG ET AL. 2010). .....	46
FIGURA 10: Localização dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados para amplificação de toda a seqüência de nucleotídeos do transcrito X1- <i>CLCN1</i> suínos.. ..	61
FIGURA 11: Representação esquemática da região entre os íntrons 14 e 16 e os <i>primers</i> utilizados no teste de genotipagem.....	64
FIGURA 12: A - posterior de dois animais afetados pela miotonia hereditária.....	72
FIGURA 13: Sequência de imagens obtidas a partir de um vídeo demonstrando dois animais afetados.....	73
FIGURA 14: Heredograma construído a partir do histórico familiar dos animais experimentais (A -V).....	74
FIGURA 15: Traçado eletromiográfico de animais afetados.....	76
FIGURA 16: Alinhamento entre as seqüências consensus dos animais afetados (Consensus Miotonicos), <i>wild types</i> ( Consensus <i>Wild Type</i> ) e a seqüência referência transcrito X1 (XM_021078461.1). .....	82
FIGURA 17: Esquema representando a deleção verificada nas seqüências de DNA do <i>CLCN1</i> dos animais afetados.....	84
FIGURA 18: Esquema representando a transcrição do <i>CLCN1</i> , na região entre o éxon 14 e o éxon 17, de animais <i>wild type</i> (A) e miotônicos (B).....	85
FIGURA 19: Eletroforese em gel de agarose a 1,5% para teste diagnóstico de miotonia hereditária em suínos.....	86
FIGURA 20: Curva de dissociação das reações para os produtos A- P8, B- P15-16, C-P14/17 e D- Bact .....	87
FIGURA 21: Gráfico de barras demonstrando os valores de expressão relativa para os produtos P8, P15-16 e P14/17 utilizando a metodologia $2^{-\Delta\Delta CT}$ .....	90
FIGURA 22: Alinhamento entre as seqüências preditas da proteína <i>CLC1</i> dos animais recessivos miotônicos ( <i>CLC1 Myotonic Consensus</i> ) e <i>wild types</i> ( <i>Wild type Consensus</i> ) comparadas as seqüências referência isoforma X1 (XP_020934220.1) e referência isoforma X2 (XP_020934221.1).....	93

FIGURA 23: Representação esquemática bidimensional de um monômero/subunidade do cotransportador <i>CLC</i> de eucarioto- <i>CmCLC</i> (Feng et al. 2010).....	94
FIGURA 24: Alinhamento das sequências referências de aminoácidos da proteína <i>CLC1</i> de 15 espécies diferentes de mamíferos.....	98
FIGURA 25: Imagens das estruturas de uma subunidade do <i>CLC1</i> , 5TQQ (magenta) e 16 (ciano).....	98
FIGURA 26: Alinhamento entre a sequência de aminoácidos referente à sequência <i>consensus</i> de RNAm dos suínos <i>wild type</i> sequenciados e a sequência de aminoácidos do modelo 5TQQ ( <i>CLCK</i> bovino)..	100
FIGURA 27: Estrutura 16, obtida por modelagem a partir da sequência obtida dos animais <i>wild type</i> .....	101

## LISTA DE FIGURAS DO ARTIGO CIENTÍFICO (ANEXO 2)

FIGURA 1: Sequência de imagens a partir de um vídeo demonstrando dois animais afetados.....	142
FIGURA 2: Heredograma construído a partir do histórico familiar dos animais experimentais (A -V).....	143
FIGURA 3: A - B = Descargas miotônicas típicas, que diminuem em amplitude e frequência e produzem o ruído característico.....	144
FIGURA 4: Esquema representando a transcrição do <i>CLCN1</i> , na região entre o éxon 13 e o éxon 17, de animais <i>wild type</i> (A) e miotônicos (B).....	146
FIGURA 5: Eletroforese em gel de agarose a 1,5% para teste diagnóstico de miotonia congênita em suínos.....	147
FIGURA 6: Imagens das estruturas de uma subunidade do <i>CLC1</i> , 5TQQ (magenta) e <i>CLC1-WT</i> modelada (ciano).....	159
FIGURA 7: Alinhamento das sequências referências de aminoácidos da proteína <i>CLC1</i> de 12 espécies diferentes de mamíferos .....	150
FIGURA 8: Estrutura <i>CLC1-WT</i> , obtida por modelagem a partir da sequência obtida dos animais <i>wild type</i> . .....	151

## **LISTA DE ANEXOS**

ANEXO 1 - Autorização pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da FMVZ-UNESP (protocolo n° 169/2015).....	134
ANEXO 2 - Trabalho científico submetido em elaboração submetido para o periódico PLOS Genetics.....	135
ANEXO 3 - Normas do periódico PLOS Genetics para elaboração de trabalho científico.....	171

## SUMÁRIO

I. INTRODUÇÃO.....	17
II. POTENCIAL DE MEMBRANA E POTENCIAL DE AÇÃO.....	20
II.A) O potencial negativo de membrana.....	20
II.B) <i>CLC</i> - canais de cloro e transportadores.....	22
II.C) O canal de cloro <i>CLC-1</i> .....	24
II.D) O gene codificador <i>CLCN-1</i> .....	30
II.E) Enfermidades associadas aos <i>CLCS</i> .....	31
II.F) Canalopatias musculares.....	32
III. ENFERMIDADES MIOTÔNICAS.....	33
III.A) Definição e classificação.....	33
III.B) Miotonias distróficas.....	34
III.C) Miotonias não distróficas.....	34
III.D) Diagnóstico das enfermidades miotônicas.....	38
III.E) Hematologia, bioquímica sérica e histopatologia.....	39
III.F) Eletromiografia.....	40
IV. MIOTONIA HEREDITÁRIA E CANAIS DE CLORO.....	43
IV.A) Terminologia.....	43
IV.B) Fisiopatologia da miotonia congênita.....	44
IV.C) Descrições de miotonia congênita.....	44
IV.D) Sinais clínicos da miotonia congênita.....	47
V JUSTIFICATIVA.....	49
VI. OBJETIVOS.....	51
VII. MATERIAL E MÉTODOS.....	53
VII.A) Animais utilizados.....	53
VII.B) Coleta de amostras biológicas.....	54
VII.C) Exame clínico dos animais.....	55
VII.D) Bioquímica sérica.....	56
VII.E) Histopatologia.....	56
VII.F) Eletromiografia.....	56
VII.G) Análise <i>in silico</i> das sequências dos transcritos x1 e x2 de rna do <i>clcn1</i> suíno.....	57
VII.H) Reações de extração de RNA, síntese de cDNA e RT-PCR.....	57
VII.I) Reações de extração de DNA e PCR.....	61
VII.J) Eletroforese.....	62
VII.K) Sequenciamento sanger.....	62
VII.L) Desenvolvimento do teste diagnóstico.....	63
VII.M) Expressão relativa de transcritos do <i>CLCN1</i> suíno.....	65
VII.N) Análise da estrutura proteica.....	66
VIII. RESULTADOS.....	70
VIII.A) Exame clínico.....	70
VIII.B) Heredograma.....	74
VIII.C) Bioquímica.....	74
VIII.D) Histopatologia.....	75
VIII.E) Eletromiografia.....	75
VIII.F) Análise <i>in silico</i> das sequências das isoformas X1 e X2 do <i>clc1</i> suíno.....	76
VIII.G) Análise das sequências transcritas do <i>CLCN1</i> .....	77
VIII.H) Sequenciamento da região entre os íntrons 14 e 16.....	82
VIII.I) Desenvolvimento do teste diagnóstico.....	85
VIII.J) Expressão relativa dos transcritos <i>CLCN1</i> .....	87
ANÁLISE DA ESTRUTURA PROTEÍCA.....	91
VIII.K) Estruturas primária e secundária.....	91
VIII.L) Estrutura terciária.....	99
IX. DISCUSSÃO.....	104
X. CONCLUSÕES.....	115
XI. BIBLIOGRAFIA.....	117
XII - ANEXOS.....	134

ARAÚJO, C.E.T. **Estudo da miotonia hereditária em suínos**. Botucatu, 2018. 181p Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, *Campus* de Botucatu, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”.

### RESUMO

A principal causa de miotonia não distrófica hereditária ocorre devido à mutações no gene *CLCN1*, codificante para a proteína *CLC1* que forma o canal iônico seletivo para o íon cloreto predominante no tecido muscular esquelético. Mutações no gene *CLCN1* foram descritas como causadoras de miotomia hereditária em humanos e em várias espécies animais. Não existe descrição de miotonia hereditária na espécie suína. O objetivo deste estudo foi realizar a caracterização clínica e molecular de uma forma de miotonia hereditária em suínos. A hipótese desse estudo foi que animais com sinais clínicos compatíveis apresentavam a miotonia hereditária. Esses animais foram avaliados sob aspectos clínicos, eletromiográficos, histopatológicos e moleculares. Os sinais clínicos verificados foram hipertrofia e rigidez musculares, miotonia com *startle response* formação de *dimples* e fenômeno *warm-up* evidentes. Não foi constatada distrofia muscular ao exame histopatológico. Ao exame eletromiográfico foram demonstradas descargas miotônicas clássicas com formação de som característico *diver bomb*. A nível molecular foi verificada a ausência dos nucleotídeos referentes aos éxons 15 e 16 utilizando amostras de cDNA dos animais afetados. No DNA genômico foi encontrada uma grande deleção de 4165pb (g. NC\_010460.4 del 6912538\_6916702) na região do gene *CLCN1*. Análises de expressão relativa demonstraram níveis de expressão em tecido muscular de animais *wild type* para um transcrito associado a miotonia hereditária em homozigotos afetados. Foi realizada modelagem da proteína *CLC1* suína a partir da sequência de animais *wild type* para a deleção. Testes moleculares foram padronizados para serem utilizados como ferramenta diagnóstica dessa enfermidade e também para a orientação dos acasalamentos nesta espécie. Esta é a primeira descrição de uma deleção genômica na região do gene *CLCN1* causadora de miotonia hereditária e da expressão de um transcrito alternativo para o gene *CLCN1*. A caracterização de uma canalopatia de canal de cloro decorrente de uma deleção no genoma nessa espécie animal poderá contribuir para estudos comparativos dessa enfermidade entre várias espécies, inclusive a humana.

Palavras chave: doença muscular, canalopatia, canal de cloro, doença hereditária, deleção.

ARAÚJO, C.E.T. **Study of hereditary myotonia in swines**. Botucatu, 2018. 181p Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, *Campus* de Botucatu, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”.

### ABSTRACT

The major cause of hereditary non-dystrophic myotonia occurs due to mutations in the *CLCN1* gene, coding for the *CLC1* protein that forms the ionic channel selective for the predominant chloride ion in skeletal muscle tissue. The resulting hereditary disease is called congenital myotonia in human medicine. Mutations in the *CLCN1* gene have been described as causing hereditary myotonia in several animal species, but in the swine species, no mutation in this gene has been described. The objective of this study was to perform the clinical and molecular characterization of hereditary myotonia in swine. The hypothesis of this study was that animals with compatible clinical signs had hereditary myotonia. These animals were evaluated under clinical, electromyographic, histopathological and molecular aspects. The clinical signs verified were muscular hypertrophy and stiffness, myotonia with startle response and formation of dimples. The phenomenon warm-up was evident. No muscular dystrophy was observed at the histopathological examination. Electromyographic examination showed classic myotonic discharges with characteristic sound. At the molecular level, the absence of nucleotides from exons 15 and 16 was verified using cDNA samples of affected animals. In genomic DNA a large deletion of 4165bp (g NC\_010460.4 del 6912538\_6916702) was found in the region of the *CLCN1* gene. Relative expression analyzes demonstrated expression levels of wild type animals for a transcript associated with hereditary myotonia in affected homozygotes. Molecular tests were standardized to be used as a diagnostic tool for this disease and also for the orientation of mating in this species. This is the first description of a genomic deletion in the region of the *CLCN1* gene that causes hereditary myotonia. Also the expression of an alternative transcript for the *CLCN1* gene. The characterization of a chloride channel channelopathy due to a deletion in the genome in this animal species may contribute to the comparative studies of this disease among several species, including human.

Keywords: voluntary muscle disorder, channelopathy, chloride channel, hereditary disease, deletion.

## PREFÁCIO

Esta tese foi escrita sob modelo formal, conforme a Portaria nº 39, de 07-04-2005, que consta no regulamento do programa de pós-graduação em Medicina Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária-FMVZ da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - UNESP. O modelo escolhido contém elementos textuais tradicionais, e ao fim da tese está o trabalho científico fruto da presente pesquisa.

Esse prefácio também informa ao leitor algumas casualidades que deram origem a esta tese. Os primeiros animais afetados pela miotonia hereditária foram encontrados no município de Igarapé-Açu, localizado no estado do Pará. Os docentes da Universidade Federal do Pará - *Campus* Castanhal, o Dr. Diomedes Barbosa e o Dr. Carlos Magno, verificaram que os animais apresentavam sinais clínicos semelhantes à miotonia hereditária verificada em búfalos, em um trabalho realizado com a participação desses docentes, anos antes. Não existe relato prévio na literatura científica relacionado ao sinal clínico de miotonia nessa espécie animal, portanto é provável que se trate de uma condição rara nessa espécie.

Em 2014, foram agrupados cinco animais adultos, dos quais 1 fêmea e 4 machos, apresentavam sinais clínicos de miotonia (F0). Esses animais afetados eram mantidos nas dependências da Universidade Federal do Pará-UFPA, *campus* Castanhal - PA, portanto, a equipe UNESP de pesquisadores responsáveis realizaram visitas a UFPA, para coleta de informações e material biológico. Nessa visita, foram realizados exames clínicos, coleta de sangue e biópsias musculares dos 5 animais afetados, e também, realizados exames de eletromiografia em 4 dos 5 animais afetados.

Foi produzida uma prole (F1) de seis animais que não apresentavam sinais clínicos de miotonia, decorrentes do cruzamento de um dos machos afetados e uma porca não afetada da raça *Large White*. Esses seis animais, dos quais 2 machos e 4 fêmeas acasalaram entre si, produzindo uma prole (F2) composta de 21 animais, dos quais 15 animais

que não apresentavam sinal clínico de miotonia e 6 animais que apresentavam sinal clínico de miotonia. Em 2015, uma segunda visita foi realizada pelos pesquisadores responsáveis à UFPA-Castanhal, nesse momento, eram mantidos 17 animais, dos quais 13 não apresentavam sinais clínicos de miotonia e 4 apresentavam sinais clínicos de miotonia. Nessa segunda visita foram realizados exames clínicos, coleta de amostras de sangue e biópsia muscular de todos os 17 animais.

Dois animais da raça *Large White* pertencentes à UFPA *campus* Castanhal-PA, e dois animais da raça *Mini Pig* provenientes do Centro de Medicina e Pesquisa em Animais Silvestres - CEMPAS da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" (UNESP), *campus* de Botucatu, SP, foram utilizados na presente pesquisa. Esses animais não tinham parentesco com os animais afetados e foram utilizados com controle nas análises moleculares.

Os resultados apresentados nesta tese foram obtidos entre o período de 2014 e 2017, entretanto, o curso de doutorado do autor desta tese teve início em Agosto de 2015. Portanto, vale salientar que os resultados discutidos nesta tese são frutos de um trabalho em equipe, iniciado em 2014, com a avaliação desses animais pelos docentes Dr. Diomedes Barbosa, Dr. Carlos Magno e também pelos docentes da UNESP-Botucatu, Dr. Luiz Resende e Dr. Alexandre Secorun Borges pela realização de exames de EMG e coleta de amostras para análise molecular, ressalto também, a colaboração da Prof Dra. Molly McCue e do Prof. Dr. João Pessoa Araújo Júnior, que tiveram fundamental participação nas etapas de investigação molecular.

## I. INTRODUÇÃO

Uma das características fundamentais da célula muscular é a capacidade de conduzir impulsos elétricos por toda a sua membrana possibilitando a propagação do potencial de ação ao longo da fibra muscular promovendo a contração de forma sincrônica. Esses impulsos são transmitidos devido às mudanças rápidas na concentração de íons entre os meios extra e intracelulares (BECK; FAHLKE; GEORGE JR., 1996; CANNON, 2006; MEOLA et al., 2003) . Essas mudanças nas concentrações iônicas são realizadas por canais iônicos específicos, que constituem uma família de glicoproteínas transmembranas existentes na maioria dos tipos celulares, principalmente nos tecidos especializados na condução de impulsos elétricos, como os tecidos muscular e nervoso (FONTAINE; HANNA; PRESS, 2010; MEOLA et al., 2003). Defeitos nos canais iônicos da musculatura podem prejudicar esse ciclo de excitabilidade da membrana, ao retardarem a repolarização sarcolemal após um evento de despolarização, possibilitando a produção de potenciais de ação não evocados, manifestando a miotomia (CANNON, 2006).

A miotonia é um sinal clínico caracterizado pelo relaxamento tardio da musculatura esquelética após contração voluntária, um estímulo elétrico ou mecânico (BARCHI, 1994; MANKODI; THORNTON, 2002; VITE et al., 1999). As miotonias podem ser hereditárias ou adquiridas. A principal causa de miotonia hereditária está relacionada a mutações no gene *CLCN1*, responsável pela codificação do canal de cloro *CLC1* da musculatura esquelética (BARCHI, 1994; NONAKA; SATOYOSHI, 1992). Até o momento, não existiam descrições de miotomia hereditária na espécie suína.

As enfermidades hereditárias podem ser controladas, evitando a reprodução de animais portadores de um ou dois alelos com a mutação causadora da doença (RIET-CORREA et al., 2001). Esse aspecto ressalta a importância da genotipagem dos indivíduos (principalmente reprodutores), possibilitando o controle da frequência de alelos relacionados a enfermidades nos rebanhos. Além disso, considerando

rebanhos comerciais como o rebanho suíno brasileiro, a existência desta enfermidade, potencialmente, reflete impactos financeiros para o setor.

Além de sua importância no agronegócio, a espécie suína também tem grande importância nas pesquisas científicas, na utilidade como modelo experimental para estudar doenças humanas. Vale ressaltar que sob o ponto de vista genômico, os porcos são mais semelhantes ao homem do que os camundongos (WERNERSSON et al., 2005).

A espécie suína foi utilizada para se estudar várias enfermidades humanas como aquelas de origem auto-imunes, congênitas, ósseas, cancro, diabetes, doenças cardiovasculares, tais como aterosclerose e hipertensão (FLISIKOWSKA; KIND; SCHNIEKE, 2014), fibrose cística (ROGERS et al., 2008), doença de Alzheimer (KRAGH et al., 2009), diabetes tipo 2 (RENNER et al., 2012), doença do rim policístico (HE et al., 2013), carcinoma mamário (LUO et al., 2011). No tocante a canais iônicos, pesquisas desenvolveram porcos geneticamente modificados, para servirem de modelos para doenças neuromusculares humanas de origem monogênica. Em problemas de condução cardíaca e arritmias devido a defeitos no canal de sódio do músculo cardíaco (PARK et al., 2015) ou como modelos para distrofia muscular de Duchenne, uma doença grave que acomete 1 em cada 3500 homens e ocorre devido à deficiência em uma proteína estrutural do músculo esquelético (KLYMIUK et al., 2013) .

Esse estudo descreve a miotonia hereditária na espécie suína, sob aspectos clínicos, histológicos e moleculares. Essa descrição pode se tornar um modelo interessante para a avaliação de variabilidade fenotípica e do perfil de expressão de variantes de RNAm-*CLCN1* entre diferentes espécies animais, inclusive a humana.

## X. CONCLUSÕES

Esse é o primeiro estudo a realizar uma descrição clínica e molecular de miotonia hereditária em suínos. Os sinais clínicos, e resultados de exames complementares como bioquímica sérica, histopatologia (H&E e PAS) e eletromiografia são consistentes com miotonia hereditária e semelhantes àqueles descritos para diversas espécies animais acometidas por essa enfermidade.

A deleção g. NC\_010460.4 del 6912538\_6916702 consiste na ausência dos éxons 15 e 16 no transcrito *CLCN1*, correspondendo à deleção de 116 aminoácidos. Esse é o primeiro estudo a descrever casos de miotonia hereditária decorrente de uma deleção no genoma envolvendo os éxons 15 e 16.

De forma inédita também, foi realizada a obtenção por homologia da estrutura terciária do CLC1 suíno, considerando a sequência X1 (XM\_021078561.1) e a sequência *consensus* dos animais *wild type* utilizados na presente pesquisa.

Pela primeira vez, foi avaliada a quantificação relativa da expressão de transcritos do *CLCN1* de indivíduos *wild type*, heterozigotos e homozigotos recessivo para uma deleção causadora de miotonia hereditária sob padrão de herança recessivo. Ficando demonstrado que animais *wild type* expressam um transcrito alternativo para o *CLCN1* (P14/17) semelhante ao transcrito expresso pelos animais afetados pela miotonia hereditária e semelhante ao transcrito alternativo X2 (XM\_021078562.1) disponível no banco de dados Refseq (NCBI).

Os resultados obtidos com essa pesquisa representam avanços significativos no conhecimento sobre a miotonia hereditária. Principalmente ressaltando a importância de regiões conservadas da proteína *CLC1* como as  $\alpha$ -hélices O, P, Q e R, o resíduo de Tirosina (Tyr-578) que participa da formação do poro seletivo para o íon Cl<sup>-</sup> e os domínios CBS. Os resultados de qPCR demonstram uma nova peculiaridade acerca da miotonia hereditária. A modelagem por homologia da estrutura terciária do *CLC1* suíno, demonstrou que a estrutura do canal de cloro *CLC-K* bovino (PDB ID: 5TQQ) é um modelo adequado para essa finalidade, podendo ser utilizado para canais *CLC1*

de outras espécies animais. Por fim, o teste genético padronizado possibilita de forma simples e com baixo custo relativo, a classificação de probandos, podendo ser utilizado para orientação dos acasalamentos e também podendo ser replicado para padronização de testes de genotipagem para mutações envolvendo grandes deleções.

## XI. BIBLIOGRAFIA

- ARGOV, Z.; MASTAGLIA, F. L. Endocrine and toxic myopathies. In: KARPATI, G. et al. (Eds.). . **Disorders of Voluntary Muscle**. 8th. ed. [s.l: s.n.]. p. 471–483.
- ARMSTRONG, C. M.; BEZANILLA, F. Charge Movement Associated with the Opening and Closing of the Activation Gates of the Na Channels. **The Journal of General Physiology**, v. 63, n. 5, p. 533–552, 1 maio 1974.
- AROMATARIS, E. C.; RYCHKOV, G. Y. ClC-1 chloride channel: Matching its properties to a role in skeletal muscle. **Clin Exp Pharmacol Physiol**, v. 33, n. 11, p. 1118–1123, 2006.
- ATKINSON, J. B.; SWIFT, L. L.; LEQUIRE, V. S. Myotonia congenita. A histochemical and ultrastructural study in the goat: comparison with abnormalities found in human myotonia dystrophica. **The American Journal of Pathology**, v. 102, n. 3, p. 324–335, mar. 1981.
- BARCHI, R. L. The pathophysiology of excitation in skeletal muscle. In: WALTON G.; HILTON-JONES, D., J. . K. (Ed.). . **Disorders of voluntary muscle**. Edinburgh: Churchill Livingstone: [s.n.]. p. 415–436.
- BAROHN, R. J.; DIMACHKIE, M. M.; JACKSON, C. E. A PATTERN RECOGNITION APPROACH TO THE PATIENT WITH A SUSPECTED MYOPATHY. **Neurologic clinics**, v. 32, n. 3, p. 569–vii, ago. 2014a.
- BAROHN, R. J.; DIMACHKIE, M. M.; JACKSON, C. E. A PATTERN RECOGNITION APPROACH TO THE PATIENT WITH A SUSPECTED MYOPATHY. **Neurologic clinics**, v. 32, n. 3, p. 569–vii, ago. 2014b.
- BATEMAN, A. The structure of a domain common to archaebacteria and the homocystinuria disease protein. **Trends in biochemical sciences**, v. 22, n. 1, p. 12–13, jan. 1997.
- BECK, C. L.; FAHLKE, C.; GEORGE JR., A. L. Molecular basis for decreased muscle chloride conductance in the myotonic goat. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 93, n. 20, p. 11248–11252, 1996.
- BECKER, P. E. Myotonia congenita and syndromes associated with myotonia. **Stuttgart: Thieme**, 1977.
- BENNETTS, B. et al. Cytoplasmic ATP-sensing domains regulate gating of skeletal muscle ClC-1 chloride channels. **The Journal of biological chemistry**, v. 280, n. 37, p. 32452–32458, set. 2005.
- BENNETTS, B. et al. Intracellular  $\beta$ -Nicotinamide Adenine Dinucleotide Inhibits the Skeletal Muscle ClC-1 Chloride Channel. **The Journal of Biological**

**Chemistry**, v. 287, n. 31, p. 25808–25820, 27 jul. 2012.

BENNETTS, B.; PARKER, M. W.; CROMER, B. A. Inhibition of skeletal muscle CLC-1 chloride channels by low intracellular pH and ATP. **The Journal of biological chemistry**, v. 282, n. 45, p. 32780–32791, nov. 2007.

BÉROUD, C. et al. Dystrophinopathy caused by mid-intronic substitutions activating cryptic exons in the DMD gene. **Neuromuscular Disorders**, v. 14, n. 1, p. 10–18, 11 abr. 2018.

BEZANILLA, F. The voltage sensor in voltage-dependent ion channels. **Physiological reviews**, v. 80, n. 2, p. 555–592, abr. 2000.

BIASINI, M. et al. SWISS-MODEL: modelling protein tertiary and quaternary structure using evolutionary information. **Nucleic acids research**, v. 42, n. Web Server issue, p. W252-8, jul. 2014.

BORGES, A. S. et al. Clinical and molecular study of a new form of hereditary myotonia in Murrah water buffalo. **Neuromuscul Disord**, v. 23, n. 3, p. 206–213, 2013.

BRETAG, A. H. **Muscle chloride channels**. [s.l.: s.n.]. v. 67

BRETAG, A. H.; MA, L. CLC-related proteins in diseases. In: ZHENG, J.; TRUDEAU, M. C. (Eds.). . **Handbook of Ion Channels**. [s.l.: s.n.]. p. 611–626.

BROCKUS, C. W. et al. Hematologic and serum biochemical reference intervals for Vietnamese potbellied pigs (*Sus scrofa*). **Comparative Clinical Pathology**, v. 13, n. 4, p. 162–165, 2005.

BROOK, J. D. et al. Molecular basis of myotonic dystrophy: expansion of a trinucleotide (CTG) repeat at the 3' end of a transcript encoding a protein kinase family member. **Cell**, v. 68, n. 4, p. 799–808, fev. 1992.

BROWN, S. C.; JIMENEZ-MALLEBERA, C. Biochemical and molecular basis of muscle disease. In: KARPATI, G. et al. (Eds.). . **Disorders of Voluntary Muscle**. [s.l.] Cambridge University Press, 2010.

BRUGNONI, R. et al. Identification of three novel mutations in the major human skeletal muscle chloride channel gene (CLCN1), causing myotonia congenita. **Hum Mutat**, v. 14, n. 5, p. 447, 1999.

BRUGNONI, R. et al. A large cohort of myotonia congenita probands: novel mutations and a high-frequency mutation region in exons 4 and 5 of the CLCN1 gene. **Journal of Human Genetics**, v. 58, n. 9, p. 581–587, 2013.

BRYANT, S. H. Cable properties of external intercostal muscle fibres from myotonic and nonmyotonic goats. **J Physiol**, v. 204, n. 3, p. 539–550, 1969.

BRYANT, S. H.; LIPICKY, R. J.; HERZOG, W. H. Variability of myotonic signs in myotonic goats. **Am J Vet Res**, v. 29, n. 12, p. 2371–2381, 1968.

BURGUNDER, J. M. et al. Novel chloride channel mutations leading to mild myotonia among Chinese. **Neuromuscul Disord**, v. 18, n. 8, p. 633–640, 2008.

CANNON, S. C. Pathomechanisms in channelopathies of skeletal muscle and brain. **Annu Rev Neurosci**, v. 29, p. 387–415, 2006.

CASTRO-CHAVEZ, F. The rules of variation: Amino acid exchange according to the rotating circular genetic code. **Journal of theoretical biology**, v. 264, n. 3, p. 711–721, 7 jun. 2010.

CATH. CATH Superfamily 1.10.3080.10. Disponível em: <[http://www.cathdb.info/version/v4\\_1\\_0/superfamily/1.10.3080.10](http://www.cathdb.info/version/v4_1_0/superfamily/1.10.3080.10)>. Acesso em: 1 dez. 2017.

CHARLET-B, N. et al. Loss of the muscle-specific chloride channel in type 1 myotonic dystrophy due to misregulated alternative splicing. **Molecular cell**, v. 10, n. 1, p. 45–53, jul. 2002.

CHEN, L. et al. Exon 17 skipping in CLCN1 leads to recessive myotonia congenita. **Muscle & nerve**, v. 29, n. 5, p. 670–676, maio 2004.

CHENG, W. et al. Myotonia congenita-associated mutations in chloride channel-1 affect zebrafish body wave swimming kinematics. **PLoS ONE**, v. 9, n. 8, p. e103445, 2014.

CHU, S. et al. A short ClC-2 mRNA transcript is produced by exon skipping. **Nucleic acids research**, v. 24, n. 17, p. 3453–3457, set. 1996.

CHU, S.; ZEITLIN, P. L. Alternative mRNA splice variants of the rat ClC-2 chloride channel gene are expressed in lung: genomic sequence and organization of ClC-2. **Nucleic acids research**, v. 25, n. 20, p. 4153–4159, out. 1997.

CLEIREN, E. et al. Albers-Schonberg disease (autosomal dominant osteopetrosis, type II) results from mutations in the CLCN7 chloride channel gene. **Human molecular genetics**, v. 10, n. 25, p. 2861–2867, dez. 2001.

COLDING-JORGENSEN, E. et al. Decrement of compound muscle action potential is related to mutation type in myotonia congenita. **Muscle & nerve**, v. 27, n. 4, p. 449–455, abr. 2003.

COOPER, C. A. et al. Hematologic and biochemical reference intervals for specific pathogen free 6-week-old Hampshire-Yorkshire crossbred pigs. **Journal of Animal Science and Biotechnology**, v. 5, n. 1, p. 5, 10 jan. 2014.

COOPER, E. C.; JAN, L. Y. Ion channel genes and human neurological disease:

recent progress, prospects, and challenges. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 96, n. 9, p. 4759–4766, 1999.

CUNHA, K. S. et al. Hybridization Capture-Based Next-Generation Sequencing to Evaluate Coding Sequence and Deep Intronic Mutations in the NF1 Gene. **Genes**, v. 7, n. 12, p. 133, 17 dez. 2016.

CUNNINGHAM, J. N. et al. Resting transmembrane potential difference of skeletal muscle in normal subjects and severely ill patients. **The Journal of clinical investigation**, v. 50, n. 1, p. 49–59, 1971.

DAVIES, N. P.; HANNA, M. G. **The skeletal muscle channelopathies: basic science, clinical genetics and treatment.** Current opinion in neurology England, out. 2001.

DAY, J. W. et al. Myotonic dystrophy type 2: molecular, diagnostic and clinical spectrum. **Neurology**, v. 60, n. 4, p. 657–664, fev. 2003.

DE DIEGO, C. et al. Novel mutations in the muscle chloride channel CLCN1 gene causing myotonia congenita in Spanish families. **J Neurol**, v. 246, n. 9, p. 825–829, 1999a.

DE DIEGO, C. et al. Novel mutations in the muscle chloride channel CLCN1 gene causing myotonia congenita in Spanish families. **Journal of Neurology**, v. 246, n. 9, p. 825–829, 1999b.

DEHAINAULT, C. et al. A deep intronic mutation in the RB1 gene leads to intronic sequence exonisation. **European journal of human genetics: EJHG**, v. 15, n. 4, p. 473–477, abr. 2007.

DUFFIELD, M. et al. Involvement of Helices at the Dimer Interface in ClC-1 Common Gating. **The Journal of General Physiology**, v. 121, n. 2, p. 149–161, fev. 2003.

DUNO, M. et al. Difference in allelic expression of the CLCN1 gene and the possible influence on the myotonia congenita phenotype. **European journal of human genetics: EJHG**, v. 12, n. 9, p. 738–743, set. 2004.

DUTZLER, R. et al. X-ray structure of a ClC chloride channel at 3.0 Å reveals the molecular basis of anion selectivity. **Nature**, v. 415, n. 6869, p. 287–294, jan. 2002.

DUTZLER, R. The structural basis of ClC chloride channel function. **Trends Neurosci**, v. 27, n. 6, p. 315–320, 2004.

DUTZLER, R.; CAMPBELL, E. B.; MACKINNON, R. Gating the selectivity filter in ClC chloride channels. **Science**, v. 300, n. 5616, p. 108–112, 2003.

- EGGERMONT, J. et al. Alternative splicing of ClC-6 (a member of the ClC chloride-channel family) transcripts generates three truncated isoforms one of which, ClC-6c, is kidney-specific. **Biochemical Journal**, v. 325, n. Pt 1, p. 269–276, 1 jul. 1997.
- ELBERS, A. R. et al. Haematology and biochemistry reference values for sows kept under modern management conditions. **The Veterinary quarterly**, v. 16, n. 2, p. 127–130, jul. 1994.
- ESTEBAN, J. et al. Identification of two mutations and a polymorphism in the chloride channel CLCN-1 in patients with Becker's generalized myotonia. **Neurogenetics**, v. 1, n. 3, p. 185–188, 1998.
- ESTEVEZ, R. et al. Barttin is a Cl<sup>-</sup> channel beta-subunit crucial for renal Cl<sup>-</sup> reabsorption and inner ear K<sup>+</sup> secretion. **Nature**, v. 414, n. 6863, p. 558–561, nov. 2001.
- ESTEVEZ, R. et al. Functional and structural conservation of CBS domains from ClC chloride channels. **The Journal of physiology**, v. 557, n. Pt 2, p. 363–378, jun. 2004.
- ESTÉVEZ, R.; JENTSCH, T. J. ClC chloride channels: Correlating structure with function. **Current Opinion in Structural Biology**, v. 12, n. 4, p. 531–539, 2002.
- FACENDA-LORENZO, M. et al. Cardiac manifestations in myotonic dystrophy type 1 patients followed using a standard protocol in a specialized unit. **Revista española de cardiología (English ed.)**, v. 66, n. 3, p. 193–197, mar. 2013.
- FENG, L. et al. Structure of a eukaryotic ClC transporter defines an intermediate state in the transport cycle. **Science (New York, N.Y.)**, v. 330, n. 6004, p. 635–641, out. 2010.
- FERRERA, L. et al. Regulation of TMEM16A Chloride Channel Properties by Alternative Splicing. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 284, n. 48, p. 33360–33368, 27 nov. 2009.
- FEZA, D. et al. Transient weakness and compound muscle action potential decrement in myotonia congenita. **Muscle & Nerve**, v. 21, n. 10, p. 1334–1337, 1998.
- FIALHO, D. et al. Chloride channel myotonia: exon 8 hot-spot for dominant-negative interactions. **Brain**, v. 130, n. Pt 12, p. 3265–3274, 2007.
- FINNIGAN, D. F. et al. A novel mutation of the CLCN1 gene associated with myotonia hereditaria in an Australian cattle dog. **J Vet Intern Med**, v. 21, n. 3, p. 458–463, 2007.

FLISIKOWSKA, T.; KIND, A.; SCHNIEKE, A. Genetically modified pigs to model human diseases. **J Appl Genet**, v. 55, n. 1, p. 53–64, 2014.

FONTAINE, B.; HANNA, M. G.; PRESS, C. U. Muscle ion channelopathies and related disorders. In: KARPATI, G. et al. (Eds.). . **Disorders of Voluntary Muscle**. 8th. ed. [s.l.] Cambridge University Press, 2010. p. 536.

FORINO, M. et al. Identification of a novel splice site mutation of CLCN5 gene and characterization of a new alternative 5'UTR end of ClC-5 mRNA in human renal tissue and leukocytes. **Journal of human genetics**, v. 49, n. 1, p. 53–60, 2004.

FORSBERG, A. et al. Resting membrane potential of skeletal muscle calculated from plasma and muscle electrolyte and water contents. **Clinical Science**, v. 92, n. 4, p. 391–396, 1997.

FOURNIER, E. et al. Electromyography guides toward subgroups of mutations in muscle channelopathies. **Annals of Neurology**, v. 56, n. 5, p. 650–661, 2004.

FRIENDSHIP, R. M. et al. Hematology and biochemistry reference values for Ontario swine. **Canadian journal of comparative medicine: Revue canadienne de médecine comparée**, v. 48, n. 4, p. 390–3, 1984.

FURMAN, R. E.; BARCHI, R. L. The pathophysiology of myotonia produced by aromatic carboxylic acids. **Annals of neurology**, v. 4, n. 4, p. 357–365, out. 1978.

GALVANI, L. De viribus electricitatis in motu musculari commentarius. **Bon. Sci. Art. Inst. Acad. Comm.**, n. 7, p. 363–418, 1791.

GANDOLFI, B. et al. A Novel Mutation in CLCN1 Associated with Feline Myotonia Congenita. **PLoS ONE**, v. 9, n. 10, p. e109926, 2014.

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

GEORGE, A L. et al. Molecular basis of Thomsen's disease (autosomal dominant myotonia congenita). **Nature genetics**, v. 3, n. 4, p. 305–310, 1993.

GHAREHBAGHI-SCHNELL, E. B. et al. Genotype-phenotype correlation in myotonic dystrophy. **Clinical genetics**, v. 53, n. 1, p. 20–26, jan. 1998.

GOLDBERG, A. L.; WITTES, R. E. Genetic code: aspects of organization. **Science (New York, N.Y.)**, v. 153, n. 3734, p. 420–424, jul. 1966.

GONORAZKY, H. et al. RNAseq analysis for the diagnosis of muscular dystrophy. **Annals of Clinical and Translational Neurology**, v. 3, n. 1, p. 55–60,

8 jan. 2016.

GRADOGNA, A. et al. Dissecting a regulatory calcium-binding site of CLC-K kidney chloride channels. **The Journal of general physiology**, v. 140, n. 6, p. 681–696, dez. 2012.

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

GUEx, N.; PEITSCH, M. C. SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: an environment for comparative protein modeling. **Electrophoresis**, v. 18, n. 15, p. 2714–2723, dez. 1997.

HAHN, C.; SALAJEGHEH, M. K. Myotonic disorders: A review article. **Iranian Journal of Neurology**, v. 15, n. 1, p. 46–53, 5 jan. 2016.

HAUG, K. et al. Mutations in CLCN2 encoding a voltage-gated chloride channel are associated with idiopathic generalized epilepsies. **Nature genetics**, v. 33, n. 4, p. 527–532, abr. 2003.

HAYWARD, L. J.; BROWN, R. H. J.; CANNON, S. C. Inactivation defects caused by myotonia-associated mutations in the sodium channel III-IV linker. **The Journal of general physiology**, v. 107, n. 5, p. 559–576, maio 1996.

HE, J. et al. Construction of a transgenic pig model overexpressing polycystic kidney disease 2 (PKD2) gene. **Transgenic Res**, v. 22, n. 4, p. 861–867, 2013.

HEATWOLE, C. et al. Laboratory abnormalities in patients with myotonic dystrophy type 2. **Archives of neurology**, v. 68, n. 9, p. 1180–1184, set. 2011.

HEATWOLE, C. R. et al. Laboratory abnormalities in ambulatory patients with myotonic dystrophy type 1. **Archives of neurology**, v. 63, n. 8, p. 1149–1153, ago. 2006.

HEATWOLE, C. R.; STATLAND, J. M.; LOGIGIAN, E. L. The diagnosis and treatment of myotonic disorders. **Muscle and Nerve**, v. 47, n. 5, p. 632–648, 2013.

HEINE, R. et al. Proof of a non-functional muscle chloride channel in recessive myotonia congenita (Becker) by detection of a 4 base pair deletion. **Hum Mol Genet**, v. 3, n. 7, p. 1123–1128, 1994.

HGDM. **Human Gene Mutation Database**. Disponível em: <<http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/index.php>>. Acesso em: 1 nov. 2017.

HICKFORD, F. H. et al. Congenital myotonia in related kittens. **J Small Anim Pract**, v. 39, n. 6, p. 281–285, 1998.

HILTON-JONES, D.; KISSEL, J. T. The clinical assessment and a guide to classification of the myopathies. In: GRIGGS, G. K. D. H.-J. K. B. R. C. (Ed.). . **Disorders of Voluntary Muscle**. 8. ed. [s.l: s.n.].

HOCHE, F. et al. Novel N-terminal truncating CLCN1 mutation in severe becker disease. **Muscle and Nerve**, v. 50, n. 5, p. 866–867, 2014a.

HOCHE, F. et al. Novel N-terminal truncating CLCN1 mutation in severe Becker disease. **Muscle Nerve**, v. 50, n. 5, p. 866–867, 2014b.

HOFFMAN, E. P. Voltage-gated ion channelopathies: inherited disorders caused by abnormal sodium, chloride, and calcium regulation in skeletal muscle. **Annu Rev Med**, v. 46, p. 431–441, 1995.

HUG, N.; LONGMAN, D.; CÁCERES, J. F. Mechanism and regulation of the nonsense-mediated decay pathway. **Nucleic Acids Research**, v. 44, n. 4, p. 1483–1495, 29 fev. 2016.

IMBRICI, P. et al. ClC-1 chloride channels: state-of-the-art research and future challenges. **Frontiers in Cellular Neuroscience**, v. 09, n. April, p. 1–15, 2015.

JAYARAM, H. et al. Structure of a Slow CLC Cl<sup>-</sup>/H<sup>+</sup> Antiporter from a Cyanobacterium. **Biochemistry**, v. 50, n. 5, p. 788–794, 8 fev. 2011.

JENTSCH, T. J. et al. Properties of voltage-gated chloride channels of the ClC gene family. **The Journal of Physiology**, v. 482, n. P, p. 19S–25S, 1995.

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

JHEE, K. H.; MCPHIE, P.; MILES, E. W. Domain architecture of the heme-independent yeast cystathionine beta-synthase provides insights into mechanisms of catalysis and regulation. **Biochemistry**, v. 39, n. 34, p. 10548–10556, ago. 2000.

JURKAT-ROTT, K.; LEHMANN-HORN, F. Review series Muscle channelopathies and critical points in functional and genetic studies. **Gene**, v. 115, n. 8, 2005a.

JURKAT-ROTT, K.; LEHMANN-HORN, F. Muscle channelopathies and critical points in functional and genetic studies. **Journal of Clinical Investigation**, v. 115, n. 8, p. 2000–2009, 2005b.

KANDEL, E. R. **Principles of Neural Science, Fifth Edition**. [s.l.] McGraw-Hill Education, 2013.

KANECO, J. J.; HARVEY, J. W.; BRUSS, M. L. **Clinical biochemistry of domestic animal**. 6. ed. [s.l: s.n.].

KARPATI, G. et al. **Disorders of Voluntary Muscle**. [s.l.] Cambridge University Press, 2010.

KATSUMATA, N. et al. A novel frameshift mutation 840delA and a novel polymorphism D203A in the steroidogenic acute regulatory protein gene in a Japanese patient with congenital lipid adrenal hyperplasia. *Mutations in brief* no. 117. Online. **Human mutation**, v. 11, n. 4, p. 331, 1998.

KEARSE, M. et al. Geneious Basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. **Bioinformatics**, v. 28, p. 1647–1649, 2012.

KIMURA, J. **Electrodiagnosis in diseases of nerve and muscle**. Philadelphia: [s.n.].

KLEM, T. B. et al. Hematologic and biochemical reference intervals for Norwegian crossbreed grower pigs. **Veterinary Clinical Pathology**, v. 39, n. 2, p. 221–226, 2010.

KLYMIUK, N. et al. Dystrophin-deficient pigs provide new insights into the hierarchy of physiological derangements of dystrophic muscle. **Hum Mol Genet**, v. 22, n. 21, p. 4368–4382, 2013.

KOCH, M. C. et al. The skeletal muscle chloride channel in dominant and recessive human myotonia. **Science**, v. 257, n. 5071, p. 797–800, 1992a.

KOCH, M. C. et al. The skeletal muscle chloride channel in dominant and recessive human myotonia. **Science (New York, N.Y.)**, v. 257, n. 5071, p. 797–800, 1992b.

KORNAK, U. et al. Loss of the ClC-7 chloride channel leads to osteopetrosis in mice and man. **Cell**, v. 104, n. 2, p. 205–215, jan. 2001.

KRAGH, P. M. et al. Hemizygous minipigs produced by random gene insertion and handmade cloning express the Alzheimer's disease-causing dominant mutation APPsw. **Transgenic Res**, v. 18, n. 4, p. 545–558, 2009.

KUBISCH, C. et al. ClC-1 Chloride Channel Mutations in Myotonia Congenita: Variable Penetrance of Mutations Shifting the Voltage Dependence. **Human Molecular Genetics**, v. 7, n. 11, p. 1753–1760, 1 out. 1998.

LAKRAJ, A. A. et al. Novel mutations in the CLCN1 gene of myotonia congenita: 2 case reports. **Yale J Biol Med**, v. 86, n. 1, p. 101–106, 2013.

LEHMANN-HORN, F. et al. Myotonia levior is a chloride channel disorder. **Human molecular genetics**, v. 4, n. 8, p. 1397–1402, ago. 1995.

LEHMANN-HORN, F.; JURKAT-ROTT, K. Voltage-gated ion channels and

hereditary disease. **Physiol Rev**, v. 79, n. 4, p. 1317–1372, 1999.

LEHMANN-HORN, F.; RUDEL, R. Channelopathies: Their Contribution to Our Knowledge About Voltage-Gated Ion Channels. **Physiology**, v. 12, n. 3, p. 105 LP-112, 1 jun. 1997.

LIM, H.-H.; STOCKBRIDGE, R. B.; MILLER, C. Fluoride-dependent interruption of the transport cycle of a CLC Cl<sup>-</sup>/H<sup>+</sup> antiporter. **Nature Chemical Biology**, v. 9, p. 721, 15 set. 2013.

LIN, M.-J. et al. Functional characterization of CLCN1 mutations in Taiwanese patients with myotonia congenita via heterologous expression. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 351, n. 4, p. 1043–1047, dez. 2006.

LIU, X.-L. et al. Myotonia congenita: novel mutations in CLCN1 gene. **Channels**, v. 9, n. 5, p. 292–298, 11 ago. 2015.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. **Methods (San Diego, Calif.)**, v. 25, n. 4, p. 402–408, dez. 2001.

LLOYD, S. E. et al. A common molecular basis for three inherited kidney stone diseases. **Nature**, v. 379, p. 445, 1 fev. 1996.

LOEWEN, M. E. et al. Isoform-specific exon skipping in a variant form of CLC-2. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Structure and Expression**, v. 1493, n. 1, p. 284–288, 2000.

LOSSIN, C.; GEORGE JR., A. L. Myotonia congenita. **Adv Genet**, v. 63, p. 25–55, 2008.

LOUET, M. et al. In silico model of the human CLC-Kb chloride channel: pore mapping, biostructural pathology and drug screening. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 7249, 2017.

LUO, Y. et al. High efficiency of BRCA1 knockout using rAAV-mediated gene targeting: developing a pig model for breast cancer. **Transgenic Res**, v. 20, n. 5, p. 975–988, 2011.

MA, L. et al. Movement of hCLC-1 C-termini during common gating and limits on their cytoplasmic location. **The Biochemical journal**, v. 436, n. 2, p. 415–428, jun. 2011.

MACIAS, M. J. et al. Myotonia-related mutations in the distal C-terminus of CLC-1 and CLC-0 chloride channels affect the structure of a poly-proline helix. **The Biochemical journal**, v. 403, n. 1, p. 79–87, abr. 2007.

MANKODI, A. et al. Muscleblind localizes to nuclear foci of aberrant RNA in

myotonic dystrophy types 1 and 2. **Human molecular genetics**, v. 10, n. 19, p. 2165–2170, set. 2001.

MANKODI, A. et al. Expanded CUG repeats trigger aberrant splicing of ClC-1 chloride channel pre-mRNA and hyperexcitability of skeletal muscle in myotonic dystrophy. **Molecular cell**, v. 10, n. 1, p. 35–44, jul. 2002.

MANKODI, A.; THORNTON, C. A. Myotonic syndromes. **Current Opinion in Neurology**, v. 15, n. 5, p. 545–552, 2002.

MARKOVIC, S.; DUTZLER, R. The Structure of the Cytoplasmic Domain of the Chloride Channel ClC-Ka Reveals a Conserved Interaction Interface. **Structure**, v. 15, n. 6, p. 715–725, 2007a.

MARKOVIC, S.; DUTZLER, R. The structure of the cytoplasmic domain of the chloride channel ClC-Ka reveals a conserved interaction interface. **Structure (London, England : 1993)**, v. 15, n. 6, p. 715–725, jun. 2007b.

MASSONE, F. **ANESTESIOLOGIA VETERINARIA: FARMACOLOGIA E TECNICAS - TEXTO E ATLAS**. [s.l.] GUANABARA, 2011.

MATTHEWS, E. et al. The non-dystrophic myotonias: Molecular pathogenesis, diagnosis and treatment. **Brain**, v. 133, n. 1, p. 9–22, 2010.

MAZON, M. J. et al. Screening for mutations in Spanish families with myotonia. Functional analysis of novel mutations in CLCN1 gene. **Neuromuscul Disord**, v. 22, n. 3, p. 231–243, 2012.

MCCORMICK, D. A. Membrane Potential and Action Potential. In: **Fundamental Neuroscience**. [s.l.] Elsevier, 2013. p. 93–116.

MCILWAIN, D. R. et al. Smg1 is required for embryogenesis and regulates diverse genes via alternative splicing coupled to nonsense-mediated mRNA decay. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 107, n. 27, p. 12186–12191, jul. 2010.

MEDGHALCHI, S. M. et al. Rent1, a trans-effector of nonsense-mediated mRNA decay, is essential for mammalian embryonic viability. **Human molecular genetics**, v. 10, n. 2, p. 99–105, jan. 2001.

MEDICAL RESEARCH COUNCIL. **Aids to the Examination of the Peripheral Nervous System**. London: [s.n.].

MEOLA, G. et al. Muscle biopsy and cell cultures: potential diagnostic tools in hereditary skeletal muscle channelopathies. **Eur J Histochem**, v. 47, n. 1, p. 17–28, 2003.

MEYER, S.; DUTZLER, R. Crystal structure of the cytoplasmic domain of the

chloride channel ClC-0. **Structure (London, England : 1993)**, v. 14, n. 2, p. 299–307, fev. 2006.

MICHELL, A. **Understanding EMG**. [s.l.] OUP Oxford, 2013.

MILLER, T. M. Differential diagnosis of myotonic disorders. **Muscle and Nerve**, v. 37, n. 3, p. 293–299, 2008.

MITROVIĆ, N. et al. Different effects on gating of three myotonia-causing mutations in the inactivation gate of the human muscle sodium channel. **The Journal of physiology**, v. 487, n. 1, p. 107–14, 1995.

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

MOON, I. S. et al. Novel CLCN1 mutations and clinical features of Korean patients with myotonia congenita. **J Korean Med Sci**, v. 24, n. 6, p. 1038–1044, 2009.

NCBI. **HomoloGene**. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/homologene/?term=clcn1>>. Acesso em: 1 dez. 2017.

NONAKA, I.; SATOYOSHI, E. Myotonic disorders. In: MASTAGLIA, F. L.; WALTON, J. N. (Eds.). **Skeletal Muscle Pathology**. Universidade de Michigan: Churchill Livingstone, 1992. p. 319–342.

O'LEARY, N. A. et al. Reference sequence (RefSeq) database at NCBI: current status, taxonomic expansion, and functional annotation. **Nucleic acids research**, v. 44, n. D1, p. D733-45, jan. 2016.

OGURA, T. et al. ClC-3B, a novel ClC-3 splicing variant that interacts with EBP50 and facilitates expression of CFTR-regulated ORCC. **FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology**, v. 16, n. 8, p. 863–865, jun. 2002.

OLIVELLA, M. et al. Relation between sequence and structure in membrane proteins. **Bioinformatics (Oxford, England)**, v. 29, n. 13, p. 1589–1592, jul. 2013.

OMIM. **Online Mendelian Inheritance in Man, OMIM (TM)**. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim/>>. Acesso em: 20 jul. 2011.

PALADE, P. T.; BARCHI, R. L. Characteristics of the chloride conductance in muscle fibers of the rat diaphragm. **The Journal of General Physiology**, v. 69, n. 3, p. 325–342, 1 mar. 1977.

PAN, Q. et al. Deep surveying of alternative splicing complexity in the human transcriptome by high-throughput sequencing. **Nature Genetics**, v. 40, p. 1413, 2 nov. 2008.

PARK, D. S. et al. Genetically engineered SCN5A mutant pig hearts exhibit conduction defects and arrhythmias. **J Clin Invest**, v. 125, n. 1, p. 403–412, 2015.

PARK, E.; CAMPBELL, E. B.; MACKINNON, R. Structure of a CLC chloride ion channel by cryo-electron microscopy. **Nature**, v. 541, n. 7638, p. 500–505, jan. 2017.

PETTERSEN, E. F. et al. UCSF Chimera--a visualization system for exploratory research and analysis. **Journal of computational chemistry**, v. 25, n. 13, p. 1605–1612, out. 2004.

PONISSERY SAIDU, S. et al. Channel properties of the splicing isoforms of the olfactory calcium-activated chloride channel Anoctamin 2. **The Journal of General Physiology**, v. 141, n. 6, p. 691 LP-703, 1 jun. 2013.

PONTING, C. P. CBS domains in CIC chloride channels implicated in myotonia and nephrolithiasis (kidney stones). **Journal of molecular medicine (Berlin, Germany)**, v. 75, n. 3, p. 160–163, mar. 1997.

PORTARO, S. et al. Clinical, Molecular, and Functional Characterization of CLCN1 Mutations in Three Families with Recessive Myotonia Congenita. **Neuromolecular Med**, 2015.

PRESTON, D.; SHAPIRO, B. **Electromyography and neuromuscular disorders**. Boston: [s.n.].

PTACEK, L. J.; JOHNSON, K. J.; GRIGGS, R. C. Genetics and physiology of the myotonic muscle disorders. **N Engl J Med**, v. 328, n. 7, p. 482–489, 1993.

PUSCH, M. et al. Mechanism of block of single protopores of the Torpedo chloride channel ClC-0 by 2-(p-chlorophenoxy)butyric acid (CPB). **The Journal of general physiology**, v. 118, n. 1, p. 45–62, jul. 2001.

PUSCH, M. Myotonia caused by mutations in the muscle chloride channel gene CLCN1. **Human mutation**, v. 19, n. 4, p. 423–434, abr. 2002.

RADOSTITS, O. M. et al. **Clínica veterinária: um tratado de doenças dos bovinos, ovinos, suínos, caprinos e eqüinos**. [s.l.] Guanabara Koogan, 2002.

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

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

RANA, S. S. et al. Paraneoplastic Isaacs' syndrome: a case series and review of the literature. **Journal of clinical neuromuscular disease**, v. 13, n. 4, p. 228–233, jun. 2012.

RANUM, L. P. et al. Genetic mapping of a second myotonic dystrophy locus. **Nature genetics**, v. 19, n. 2, p. 196–198, jun. 1998.

RENNER, S. et al. Changing metabolic signatures of amino acids and lipids during the prediabetic period in a pig model with impaired incretin function and reduced beta-cell mass. **Diabetes**, v. 61, n. 8, p. 2166–2175, 2012.

RHODES, T. H. et al. A missense mutation in canine ClC-1 causes recessive myotonia congenita in the dog1. **FEBS Letters**, v. 456, n. 1, p. 54–58, 1999.

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

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

RICKER, K. et al. Linkage of proximal myotonic myopathy to chromosome 3q. **Neurology**, v. 52, n. 1, p. 170–171, jan. 1999.

RIET-CORREA, F. et al. **Doenças de ruminantes e eqüinos**. [s.l.] Varela, 2001.

RIORDAN, J. R. et al. Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA. **Science (New York, N.Y.)**, v. 245, n. 4922, p. 1066–1073, set. 1989.

ROGERS, C. S. et al. Disruption of the CFTR gene produces a model of cystic fibrosis in newborn pigs. **Science**, v. 321, n. 5897, p. 1837–1841, 2008.

ŠALI, A.; BLUNDELL, T. L. Comparative protein modelling by satisfaction of spatial restraints. **J. Mol. Biol.**, v. 234, p. 779–815, 1993.

SAMAHA, F. J. et al. Studies on myotonia: Biochemical and electron microscopic studies on myotonia congenita and myotonia dystrophica. **Archives of Neurology**, v. 17, n. 1, p. 22–33, 1 jul. 1967.

SANGIUOLO, F. et al. Identification of five new mutations and three novel polymorphisms in the muscle chloride channel gene (CLCN1) in 20 Italian patients with dominant and recessive myotonia congenita. Mutations in brief no. 118. Online. **Hum Mutat**, v. 11, n. 4, p. 331, 1998.

SASAKI, R. et al. Novel chloride channel gene mutations in two unrelated Japanese families with Becker's autosomal recessive generalized myotonia. **Neuromuscular disorders: NMD**, v. 9, n. 8, p. 587–592, dez. 1999.

SAVIANE, C.; CONTI, F.; PUSCH, M. The muscle chloride channel ClC-1 has a double-barreled appearance that is differentially affected in dominant and recessive myotonia. **J Gen Physiol**, v. 113, n. 3, p. 457–468, 1999.

SHAN, X. et al. Mutations in the regulatory domain of cystathionine beta synthase can functionally suppress patient-derived mutations in cis. **Human molecular genetics**, v. 10, n. 6, p. 635–643, mar. 2001.

SHIMADA, K. et al. Expression and canalicular localization of two isoforms of the ClC-3 chloride channel from rat hepatocytes. **American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. 279, n. 2, p. G268–G276, 1 ago. 2000.

SILVERTHORN, D. U. **Human physiology an integrated approach**. 5th. ed. [s.l: s.n.].

SIMON, D. B. et al. Mutations in the chloride channel gene, CLCNKB, cause Bartter's syndrome type III. **Nature genetics**, v. 17, n. 2, p. 171–178, out. 1997.

SIMPSON, B. J. et al. Characterization of three myotonia-associated mutations of the CLCN1 chloride channel gene via heterologous expression. **Human mutation**, v. 24, n. 2, p. 185, ago. 2004.

SKÁLOVÁ, D. et al. CLCN1 mutations in Czech patients with myotonia congenita, in silico analysis of novel and known mutations in the human dimeric skeletal muscle chloride channel. **PLoS ONE**, v. 8, n. 12, p. 1–10, 2013.

STAUBER, T.; WEINERT, S.; JENTSCH, T. J. Cell biology and physiology of CLC chloride channels and transporters. **Comprehensive Physiology**, v. 2, n. 3, p. 1701–1744, jul. 2012.

STEINMEYER, K. et al. Inactivation of muscle chloride channel by transposon insertion in myotonic mice. **Nature**, v. 354, n. 6351, p. 304–308, 1991.

STEINMEYER, K.; ORTLAND, C.; JENTSCH, T. J. Primary structure and functional expression of a developmentally regulated skeletal muscle chloride channel. **Nature**, v. 354, n. 6351, p. 301–304, nov. 1991.

SUN, C. et al. Spectrum of CLCN1 mutations in patients with myotonia congenita in Northern Scandinavia. **European journal of human genetics: EJHG**, v. 9, n. 12, p. 903–909, dez. 2001.

SWISS-MODEL. **Swiss-Model Help. Introduction to Swiss-Model**. Disponível em:

<[https://swissmodel.expasy.org/docs/help#model\\_results](https://swissmodel.expasy.org/docs/help#model_results)>.

THOMSEN, J. Töniche Krämpfe in willkürlich beweglichen Muskeln in Folge von ererbter psychischer. **Arch. Psychiatrie Nervenkrankheiten**, n. 6, p. 702–718, 1876.

TOLL, J.; COOPER, B.; ALTSCHUL, M. Congenital myotonia in 2 domestic cats. **J Vet Intern Med**, v. 12, n. 2, p. 116–119, 1998.

TRIP, J. et al. Redefining the clinical phenotypes of non-dystrophic myotonic syndromes. **Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry**, v. 80, n. 6, p. 647 LP-652, maio 2009.

TSENG, P.-Y.; BENNETTS, B.; CHEN, T.-Y. Cytoplasmic ATP Inhibition of CLC-1 Is Enhanced by Low pH. **The Journal of General Physiology**, v. 130, n. 2, p. 217–221, 2 ago. 2007.

ULZI, G. et al. Myotonia congenita: novel mutations in CLCN1 gene and functional characterizations in Italian patients. **J Neurol Sci**, v. 318, n. 1–2, p. 65–71, 2012.

UNIPROTKB. **UniProtKB - P35523 (CLCN1\_HUMAN)**. Disponível em: <<http://www.uniprot.org/uniprot/P35523>>. Acesso em: 1 nov. 2017.

VAN NIEKERK, I. J.; JAROS, G. G. Myotonia in the calf: a case report. **S Afr Med J**, v. 44, n. 31, p. 898–899, 1970.

VAZ-DRAGO, R.; CUSTODIO, N.; CARMO-FONSECA, M. Deep intronic mutations and human disease. **Human genetics**, v. 136, n. 9, p. 1093–1111, set. 2017.

VITE, C. H. et al. Myotonic Myopathy in a Miniature Schnauzer: Case Report and Data Suggesting Abnormal Chloride Conductance Across the Muscle Membrane. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 12, n. 5, p. 394–397, 1998.

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

WANG, E. T. et al. Alternative isoform regulation in human tissue transcriptomes. **Nature**, v. 456, n. 7221, p. 470–476, nov. 2008.

WEINREICH, F.; JENTSCH, T. J. Pores Formed by Single Subunits in Mixed Dimers of Different CLC Chloride Channels. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 4, p. 2347–2353, 2001.

WERNERSSON, R. et al. Pigs in sequence space: a 0.66X coverage pig genome survey based on shotgun sequencing. **BMC Genomics**, v. 6, p. 70, 2005.