

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

**INVESTIGAÇÃO DAS MUTAÇÕES RESPONSÁVEIS PELA
DOENÇA DE ACÚMULO DE GLICOGÊNIO TIPO II E PELA
MIASTENIA HEREDITÁRIA EM BOVINOS DA RAÇA BRAHMAN
NO BRASIL**

ANELIZE DE SOUZA TRECENTI

**Botucatu - SP
Novembro de 2017**

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

**INVESTIGAÇÃO DAS MUTAÇÕES RESPONSÁVEIS PELA
DOENÇA DE ACÚMULO DE GLICOGÊNIO TIPO II E PELA
MIASTENIA HEREDITÁRIA EM BOVINOS DA RAÇA BRAHMAN
NO BRASIL**

ANELIZE DE SOUZA TRECENTI

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

Orientador: Prof. Dr. José Paes de Oliveira Filho

**Botucatu - SP
Novembro 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

Trecenti, Anelize de Souza.

Investigação das mutações responsáveis pela doença de acúmulo de glicogênio tipo II e pela miastenia hereditária em bovinos da raça Brahman no Brasil / Anelize de Souza Trecenti. - 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. Zebu - Doenças. 2. Síndromes miastênicas congênitas. 3. Glicogênio. 4. Doença de depósito de glicogênio tipo II. 5. Mutação (Biologia).

Palavras-chave: Brasil; Doença de Pompe; Gado Brahman; Síndrome miastênica congênita.

Nome do autor: Anelize de Souza Trecenti

Título: INVESTIGAÇÃO DAS MUTAÇÕES RESPONSÁVEIS PELA
DOENÇA DE ACÚMULO DE GLICOGÊNIO TIPO II E PELA MIASTENIA
HEREDITÁRIA EM BOVINOS DA RAÇA BRAHMAN NO BRASIL

COMISSÃO EXAMINADORA

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

Prof. Dr. Alexandre Secorun Borges
Membro
Departamento de Clínica Veterinária
FMVZ – UNESP – Botucatu

Prof. Dr. Diego José Zanzarini Delfiol
Membro
Departamento de Clínica Veterinária
UFU- Uberlândia-MG

Data da defesa: 01 de Novembro de 2017.

AGRADECIMENTOS

À Deus, pela dádiva da vida, por me dar saúde, disposição e por sempre me direcionar para os melhores caminhos.

Aos meus pais, Luiz Antônio Trecenti e Sônia Cristina de Souza Trecenti, por todo amor, dedicação, incentivo e força para nunca desistir. Ao meu irmão, Luis Otávio de Souza Trecenti, pelo amor, amizade e por estar ao meu lado em todos os momentos.

Ao meu noivo, Murilo Teixeira Santana, por todo amor, companheirismo, compreensão, paciência, amizade e por todos os conselhos.

Ao meu orientador, José Paes de Oliveira Filho, pela orientação, pelo incentivo, pela confiança, pelas oportunidades e pelos conselhos que me ajudaram a crescer.

Aos professores Alexandre Secorun, Simone Chiacchio, Rogério Amorim, Roberto Calderon, por todo ensinamento durante a Pós graduação.

Aos meus professores e orientadores da Graduação, em especial Diego Delfiol, Fernanda Mobaid, Bianca Gerardi e Gisele dos Reis por sempre me incentivar nos meus estudos.

Aos amigos da salinha, Aline Angela, Campo Amor, César Araújo, Danilo Andrade, Giovane Olivo, Mariana Herman, Juliana Mira, Natalia Dias, Natalia Lourenço, Larissa Andrade, Raíssa Leite por todo o convívio e aprendizado.

Às amigas da “Família de Botucatu” Marina Gonzales e Isadora Roratto por serem tão companheiras e estarem sempre à disposição para as discussões clínicas na mesa da cozinha.

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

À ABCZ (Associação Brasileira de Criadores de Zebu) por ceder o material utilizado no trabalho.

À CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pelo auxílio à pesquisa, possibilitando sua execução.

Ao CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) pela concessão da bolsa de estudo.

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

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I

TABELA 1 - Maiores rebanhos e maiores produtores de carne bovina do mundo.....	16
TABELA 2 - Maiores exportadores de carne bovina em 2015	17

SUMÁRIO

Resumo.....	i
Abstract.....	ii
Capítulo I.....	10
1. Introdução	11
2. Revisão de literatura	14
2.1. A raça Brahman no Brasil	14
2.2. Importância das enfermidades genéticas em ruminantes	17
2.3. Doença de acúmulo de glicogênio tipo II (GSD II)	19
2.4. Síndrome miastênica congênita (CMS).....	25
3.Referências bibliográficas	29
Capítulo II.....	35
Trabalho redigido para a revista “Veterinary Records”	36
<u>Título:</u> Prevalence of mutations responsible for glycogen storage disease type-II and congenital myasthenic syndrome in Brazilian Brahman Cattle	36
Normas de submissão: Instruções aos autores: Veterinary Records.....	47
ANEXOS:	61

TRECENTI, A. S. **Investigação das mutações responsáveis pela doença de acúmulo de glicogênio tipo II e pela miastenia hereditária em bovinos da raça Brahman no Brasil.** Botucatu – SP, 2017. 61p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu.

RESUMO

A doença de acúmulo de glicogênio tipo II (GSD-II) e a síndrome miastênica congênita (CMS) são enfermidades autossômicas recessivas importantes no gado Brahman. Nenhum estudo avaliou previamente a prevalência de mutações responsáveis pelo GSD II (E7, c.1057_1058delTA e E13, c.1783C>T) ou CMS (CHRNE, c.470del20) nos bovinos Brahman brasileiro. O objetivo deste estudo foi investigar a presença dessas mutações em 276 amostras de bulbos pilosos de bovinos PO brasileiros e em 35 amostras de sêmen de touros da raça Brahman, rotineiramente utilizadas em programas de melhoramento genético no Brasil. Dos 276 bovinos Brahman testados, 7,3% foram identificados como heterozigotos para E7. Enquanto, todos os bovinos Brahman estudados eram *wild-type* para E13. Para as amostras de sêmen foi identificado 8,6% (3/35) heterozigotos para a E7 e para a E13 nenhum animal foi identificado. A mutação CHRNE, 0,73% das amostras de bulbo piloso são heterozigotos, enquanto para as amostras de sêmen, nenhum animal foi considerado heterozigoto. Este resultado indica que as mutações E7 e CHRNE estão presentes no rebanho Brahman brasileiro, e medidas de controle devem ser adotadas para evitar um aumento na incidência de GSD-II e CMS no gado Brahman no Brasil.

Palavras-chave: gado Brahman; síndrome miastênica congênita; Doença de Pompe, Brasil.

TRECENTI, A. S. **Investigation of mutations responsible for glycogen storage disease type-II and congenital myasthenic syndrome in Brazilian Brahman Cattle.** Botucatu – SP, 2017. 61p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu.

ABSTRACT

Glycogen storage disease type II (GSD-II) and congenital myasthenic syndrome (CMS) are important autosomal recessive disorders in Brahman cattle. No study has previously evaluated the prevalence of mutations responsible for GSD II (E7, c.1057_1058delTA; and E13, c.1783C>T) or CMS (CHRNE, c.470del20) in Brazilian Brahman cattle. The objective of this study was to investigate the presence of these mutations in 276 hair roots from purebred Brazilian Brahman cattle and in 35 semen samples from purebred Brahman bulls that were routinely used in breeding programmes in Brazil. Of the 276 Brahman cattle tested, 7.3% were identified as heterozygous for E7. All Brahman cattle studied were homozygous for the wild-type E13 allele. The E7 mutations was identified as heterozygous in 8.6% (3/35) of the commercial semen samples, whereas the E13 mutations was not identified. The CHRNE mutation was identified as heterozygous in 0.73% of the hair root samples, but this mutation was not present in any semen sample assessed. In summary, the E7 and CHRNE mutations are present in the Brazilian Brahman herd, and control measures should be adopted to prevent an increase in the incidence of GSD-II and CMS in Brahman cattle in Brazil.

Keywords: Brahman cattle; congenital myasthenic syndrome; Pompe Disease, Brazil.

Capítulo I

1. Introdução

Doença de acúmulo de glicogênio (GSD II), também denominada glicogenose generalizada ou glicogenose tipo II ou ainda doença de Pompe e a síndrome miastênica congênita (CMS) ou Miastenia hereditária são duas enfermidades descritas no rebanho de Brahman australiano (O'SULLIVAN et al., 1981) e sul-africano (THOMPSON et al., 1998). A GSD II é causada por mutações (E7, c.1057 Δ TA; e E13, c.1783C>T) no gene da α -glicosidase ácida (AAG) (DENNIS et al., 2002). Entretanto, existe uma terceira mutação, E9: c.1351C>T, presente também no gene AAG, que é responsável pela redução em 70% da atividade da enzima, porém não causa enfermidade clínica nessa raça (DENNIS et al., 2002).

A enzima α -glicosidase ácida é responsável pela transformação do glicogênio em glicose e a falha de produção desta enzima ou a presença da enzima afuncional faz com que ocorra o acúmulo de glicogênio dentro dos lisossomos em todas as células do organismo, entretanto os efeitos são mais evidenciados nos músculos (HERS, 1963). Os principais sinais clínicos observados em bezerros com a enfermidade, inicialmente, são: retardo no crescimento, fraqueza muscular e hiperestesia quando manejados (O'SULLIVAN et al., 1981; REICHMANN et al., 1993), com o tempo evidencia-se hipometria, tremores musculares, apatia, letargia, dificuldade de se levantar e de acompanhar a mãe e quedas constantes (O'SULLIVAN et al., 1981; REICHMANN et al., 1993; ZLOTOWSKI et al., 2005). Nos estágios finais, os animais adotam base ampla quando estão em posição quadrupedal,

arqueamento do dorso e pescoço, ocasionalmente diminuição dos tónus da língua, prostração e decúbito permanente (REICHMANN et al., 1993).

A síndrome miastênica congênita ou miastenia hereditária é resultado da deleção (c.470Δ20) no gene *CHRNE*, que tem como resultado a substituição de 342 resíduos de aminoácidos da subunidade épsilon do receptor de acetilcolina 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: fraqueza muscular com piora ao exercício (KRANER et al., 2002). No entanto, há evidências de que os animais heterozigotos, que são clinicamente normais, tenham um efeito positivo em seu ganho de peso vivo diário (PV), sendo este aos 600 dias de vida em média 13,5 kg maior nos animais heterozigotos em comparação aos animais wild type (THOMPSON et al.,2007). Esta vantagem pode promover o aumento da frequência alélica na população de bovinos da raça Brahman, uma vez que os proprietários podem querer direcionar os cruzamentos com o objetivo de produzirem mais animais heterozigotos.

A manifestação clínica mais comum das duas enfermidades, portanto, é a fraqueza muscular progressiva, levando à morte neonatal ou até a idade de desmame. Por isso, medidas de controle, assim como ocorre na Austrália, devem começar a ser tomadas para impedir a disseminação dessas doenças no rebanho nacional de Brahman. Dentre elas, a genotipagem dos animais e permissão de entrada no país apenas daqueles indivíduos que apresentarem resultado negativo para a mutação (ABBA,2016).

O objetivo do presente estudo foi estimar a prevalência de animais heterozigotos para as mutações E7 e E13, responsáveis pela GSD II, e para a mutação no gene *CHRNE* (c.470Δ20), responsável pela Miastenia hereditária em bovinos da raça Brahman, oriundos de vários estados brasileiros e de reprodutores importados e nacionais presentes no Brasil.

2. Revisão de literatura

2.1. A raça Brahman no Brasil

A raça Brahman; resultado do cruzamento das raças Nelore, Gir, Guzerá e Krishna Valley; é muito conhecida por ser um zebu robusto e muito adaptável em várias condições climáticas, destaca-se também pela sua habilidade materna, fertilidade, docilidade, precocidade em acabamento e excelente ganho de peso em carcaça com alto percentual de musculatura (ABBA, 2016). Teve sua origem no século XIX, no Sul dos Estados Unidos da América. Sua introdução no Brasil ocorreu em 1994, com a importação de animais originários dos EUA e, posteriormente, da Argentina, Colômbia e Paraguai. Um total de 976 animais vivos entraram no país até abril de 1994 e, desde então, a raça está em constante crescimento. Segundo o anuário DBO (2011), o Brahman se tornou a segunda raça zebuína mais valorizada no ano. Comercializou-se mais de R\$ 22 milhões em leilões, com valorização de 80% em seus reprodutores, com 224 opções de touros disponíveis em centrais de reprodução do Brasil e 50% de matrizes no mesmo período. Além de exportar sua genética para mais de 80 países (ACBB,2016).

Pode ser observado por meio de dados estatísticos da Associação Brasileira dos Criadores de Zebu (ABCZ), que no período de 1997 a 2016, houve um crescimento dos registros genealógicos de nascimento de aproximadamente 126% por ano, e o total de animais, até o momento, é de aproximadamente de 190 mil indivíduos registrados PO. Esse total é composto por 93.623 mil fêmeas e 96.299 mil machos (ABCZ,2016).

Segundo a *American Breeders Brahman Association*, o nome pelo qual o gado é conhecido (Brahman) significa “um novo ciclo” e, a partir de sua criação, representou uma divisão de águas na pecuária americana. Isso porque tornou possível uma pecuária de corte rentável e sustentável, já que a raça passou a ser utilizada como grupo étnico ou em cruzamentos com as raças europeias especializadas para a produção de carne (ACBB, 2016).

Já na pecuária brasileira, o Brahman tem sido muito utilizado para a realização de cruzamento industrial com as mais diversas raças existentes para corte. 1º país no ranking de maior rebanho de bovinos do mundo, o que equivale a 209,13 milhões de cabeças distribuídas em 167 milhões de hectares, (1,25 cabeça/ha) (Tabela 2) e o 2º maior exportador de carne bovina no ano de 2015, com 1,88 milhões de toneladas equivalentes de carcaça (TEC), exportada, perdendo apenas para a União Europeia (Tabela 3) e 212.183 cabeças exportadas vivas (ABIEC, 2016), Países exportadores de carne, assim como o Brasil, usam como base o gado Brahman. Entretanto, o melhor exemplo é a Austrália, o terceiro maior exportador de carne mundial, onde 70% de seu rebanho de corte tem grau de sangue da raça. Os Estados Unidos, Colômbia, África do Sul e México também têm importantes rebanhos de corte com base no Brahman (ACBB, 2016).

TABELA 1 - Maiores rebanhos e maiores produtores de carne bovina do mundo.

País	Bovinos (milhões cabeças)	% mundial	Produção de carne (mil TEC)	% mundial
Brasil	209,1	18,1	9.561,1	14,0
Índia	187,3	12,8	2.881,7	4,2
China	116,8	8,6	6.443,1	9,4
EUA	88,7	5,4	10.818,5	15,8
Etiópia	57,0	3,5	328,9	0,5
Argentina	52,0	3,2	2.822,0	4,1
Paquistão	39,9	4,5	1.741,9	2,6
México	31,8	1,9	1.763,8	2,6
Austrália	28,8	1,7	2.299,1	3,4
Tanzânia	25,1	1,5	315,0	0,5
União Europeia	89,9	5,5	7.462,9	10,9
Outros	520,9	33,2	21.835,4	32,0
Mundo	1447,4	100,0	68.273,3	100,0

*TEC- Toneladas Equivalentes de Carcaça

Fonte: ABIEC, 2016.

TABELA 2 - Maiores exportadores de carne bovina em 2015

País	Exportações (mil TEC)*
União Europeia	2.991,3
Brasil	1.882,0
Índia	1.722,4
Austrália	1.498,7
EUA	1.060,1
Nova Zelândia	524,4
Uruguai	396,0
Canadá	320,5
Paraguai	285,4
Argentina	220,3
Bielorrússia	183,5
Mundo	11.807,0

*Carnes bovina e bubalina.

Fonte: ABIEC, 2016

2.2. Importância das enfermidades genéticas em ruminantes

Enfermidades genéticas tem distribuição mundial e podem causar aborto ou morte neonatal levando a perdas reprodutivas consideráveis. 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 (JOLLY, 2002.).

Os genes recessivos são a mais importante forma de transmissão hereditária destas enfermidades. Estes genes são transmitidos pelos indivíduos fenotipicamente normais (heterozigotos), deste modo, perpetuam-se nas raças das diferentes espécies. Os genes dominantes manifestam-se na primeira geração, em cruzamentos de animais portadores heterozigotos com indivíduos homozigotos normais, sendo que as enfermidades transmitidas desta forma são mais facilmente controladas (LEIPOLD & DENNIS, 1980).

A bovinocultura moderna faz uso de biotecnologias avançadas, incluindo a inseminação artificial, fertilização *in vitro* e transferência de embriões, o que permite que o sêmen de touros considerados de alto valor genético seja comercializado entre diversos países (MEYDAN et al., 2010). A endogamia na população bovina tem aumentado o risco de ocorrência de enfermidades genéticas, pois o amplo uso de poucos touros de “elite” eleva a probabilidade da união de dois genes recessivos com mutação no genótipo de um animal (GENTILI & TESTONI, 2006). A ocorrência de defeitos congênitos em bovinos está estimada entre 0,2% e 3%, em todo o mundo e seu conhecimento depende da frequência com que os mesmos são estudados e descritos (LEIPOLD & DENNIS, 1980).

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 acontecem na forma de polimorfismos de nucleotídeos únicos (SNP); deleções ou inserções de nucleotídeos ou genes inteiros. Nos animais 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 ou eliminando a função da proteína ou afetando o padrão de *splicing* do RNA mensageiro (IBEAGHA-AWEMU et al., 2008).

O mapeamento genético, com o objetivo de controlar enfermidades genéticas, tem um maior potencial de desenvolvimento na medicina veterinária do que na humana devido às questões éticas. Isso acontece pelo controle da criação animal, o curto intervalo de tempo entre gerações e o melhoramento genético de uma raça influenciar a natureza hierárquica da criação animal, com a maioria dos reprodutores utilizados em uma raça pertencentes a uma pequena população conhecida através do pedigree. Além disso, o uso da inseminação artificial pode difundir rapidamente as mudanças genéticas, principalmente em bovinos (HEALLY, 1995).

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). Os distúrbios causados por esses alelos são principalmente herdados de forma autossômica recessiva, sendo letais para animais homocigotos (CIEPŁOCH et al., 2017).

2.3. Doença de acúmulo de glicogênio tipo II (GSD II)

Doença de acúmulo de glicogênio tipo II (GSD II), denominada como glicogenose generalizada (GG) ou doença de Pompe é uma enfermidade

autossômica recessiva descrita em humanos e em algumas espécies de animais domésticos como cães, gatos, ovelhas (SANDSTRÖM et al., 1969; MOSTAFA, 1970; MANKTELOW & HARTLEY, 1975), equinos (ARAÚJO, 2015) e em bovinos das raças Shorthorn (RICHARDS et al., 1977) e Brahman (O'SULLIVAN et al., 1981). Recentemente foi descrita na raça Droughtmaster, de origem australiana, oriunda do cruzamento de bovinos Brahman e Shorthorn (LYON et al., 2017). Consiste em uma deficiência da enzima α -glicosidase ácida responsável pelo acúmulo de glicogênio nos lisossomos (WISSELAAR et al., 1993).

Lisossomos são organelas presentes no citoplasma de todas as células, responsáveis pelo catabolismo de constituintes celulares e materiais extracelulares, que entram no sistema vacuolar por processos de endocitose ou autofagia. Muitas doenças de acúmulo lisossomal são transmitidas como características autossômicas recessivas e representam mutações gênicas específicas. Enquanto a deleção gênica resulta em falha na síntese da enzima, a mutação leva à produção de enzimas malformadas (SUMMERS et al., 1995). No entanto, algumas plantas tóxicas também podem causar o acúmulo lisossomal, por possuir substâncias que inibem a ação de diferentes enzimas destas organelas (JOLLY et al., 1977). Dentre elas, os gêneros de *Swainsona* (HUXTABLE & DORLING, 1982), *Astragalus*, *Oxytropis* e as espécies *Sida carpinifolia*, *Ipomoea carnea*, *Solanum fastigiatum* e *Solanum kwebense* (O'SULLIVAN et al., 1981).

A doença de Pompe recebeu o nome do médico patologista holandês Joanes Cassianus Pompe, nascido em 1901 que, durante sua vida acadêmica,

investigou os principais sinais clínicos da enfermidade após atender uma criança de sete meses de idade com hipertrofia cardíaca idiopática e percebeu que os sinais clínicos poderiam estar associados ao acúmulo de glicogênio (O'DONNELL, 2009).

As glicogenoses são síndromes hereditárias nas quais há defeitos enzimáticos no metabolismo de carboidratos dando às células um aspecto espumoso. As células mais afetadas são os neurônios, hepatócitos, leucócitos e células tubulares renais (CHEVILLE,1988). O glicogênio, no entanto, é a forma de armazenamento da glicose e representa um mecanismo metabolizável rápido desta fonte energética. Seus principais depósitos são encontrados no fígado e nos músculos esqueléticos, enquanto outras células podem armazenar pequenas quantidades. Além disso, tem função de reserva para a síntese de ATP em músculos durante sua contração e no fígado mantém a glicemia, principalmente nos estágios de jejum. Sua síntese e degradação dependem de enzimas específicas, que se situam no fígado e nos músculos, para atenuar dois tipos de ligações (CHAMPE & HARVEY,1996).

Assim como as demais doenças de acúmulo lisossomal, a GSD II em bovinos da raça Brahman serviu de modelo experimental para estudo em humanos. A análise de alterações morfológicas permitiu melhor compreensão dos mecanismos fisiopatológicos da doença, facilitando assim os métodos diagnósticos para estas enfermidades (JOLLY & WALKLEY, 1997).

A GSD II é caracterizada pela ocorrência de mutações no gene da α -glicosidase ácida, que impede parcial ou completamente a sua biossíntese e conseqüentemente o acúmulo lisossomal de glicogênio (BIJVOET et al., 1998).

Em bovinos, é decorrente da síntese defeituosa de polipeptídios desta enzima, resultante da terminação prematura da tradução causada por duas mutações independentes. A primeira é uma deleção de dois nucleotídeos no éxon 7 (c.1057 Δ TA) e a segunda é uma substituição de uma citosina por uma timina no éxon 13 (c.1783C>T). Ambas criam códons finalizadores prematuros nos éxons 8 e 13, respectivamente. Outros SNPs estão presentes na sequência codificante da α -glicosidase ácida em bovinos, dentre eles, há uma substituição de uma citosina por uma timina no éxon 9 (c.1351C>T), que é responsável por reduzir de 70 a 80% da atividade enzimática, porém, não apresentando manifestações clínicas (DENNIS et al., 2002).

Além da doença de armazenamento de glicogênio tipo II, há também estudos sobre o tipo IV ou conhecida também como deficiência de miofosforilase. É uma enfermidade de caráter autossômico recessivo, que acomete bovinos da raça Charolês, decorrente de uma mutação no gene *PYGM* caracterizada por uma substituição de citosina por timina no nucleotídeo 1468, no éxon 12 (c.1468C>T). Animais com deficiência desta enzima apresentam dor muscular, são incapazes de suportar exercícios, e após o esforço físico, apresentam urina de coloração marrom e níveis de creatinina quinase aumentados (CIEPŁOCH et al., 2017).

A variação fenotípica na doença de Pompe é mais bem explicada por diferentes níveis residuais de atividade enzimática. O fenótipo clínico é bastante influenciado pela combinação de alelos mutantes e nos níveis resultantes de atividade residual da α -glicosidase ácida. Em humanos, a forma infantil apresenta pouca atividade enzimática, enquanto que pacientes mais

velhos, ou moderadamente afetados apresentam níveis de atividade enzimática em torno de 25% do valor controle. Pacientes com a forma infantil possuem armazenamento massivo de glicogênio em muitos tecidos, incluindo o coração, musculatura esquelética e lisa, fígado, rins, sistema nervoso central (SNC) e periférico. Já na forma tardia, o acúmulo é predominante na musculatura esquelética, sendo mínimo ou ausente nos demais tecidos (GIESELMANN, 1995).

Os principais sinais clínicos observados em bezerros com a enfermidade inicialmente são: retardo no crescimento, fraqueza muscular e hiperestesia quando manejados (O'SULLIVAN et al., 1981; REICHMANN et al., 1993), com o tempo, evidencia-se hipometria, tremores musculares, apatia, letargia, dificuldade de se levantar e de acompanhar a mãe e quedas constantes (O'SULLIVAN et al., 1981; REICHMANN et al., 1993; ZLOTOWSKI et al., 2005). Nos estágios finais, os animais adotam base ampla quando estão em posição quadrupedal, arqueamento do dorso e pescoço, ocasionalmente diminuição dos tônus da língua, prostração e decúbito permanente. Sugere-se que a doença na raça Brahman é semelhante à forma infantil da doença em humanos, pelo fato de seu desenvolvimento preceder a puberdade e apresentar expectativa de vida menor que 12 meses (REICHMANN et al., 1993).

Nos achados histológicos de animais doentes, é possível observar vacuolização do citoplasma celular de diversos tecidos, lesões mais acentuadas no SNC, principalmente em neurônios de núcleo maior, na base do cérebro e nos cornos laterais da medula espinhal. As fibras de Purkinje do

coração podem conter tumefações, vacúolos e grande quantidade de matérias PAS positivo, os quais são digeridos com tratamento prévio pela diástase. Podem apresentar também vacúolos em miocárdio, musculatura esquelética, hepatócitos, epitélio tubular renal, epitélio glandular da tireoide, musculatura lisa dos intestinos, rúmen e abomaso e em células ganglionares da retina (O' SULLIVAN et al.,1981).

O diagnóstico da enfermidade é realizado através do histórico do animal, sinais clínicos e achados laboratoriais como a glicosúria e elevação da atividade sérica de CK e AST (REICHMANN et al.,1993). Confirma-se o diagnóstico com testes moleculares, que localizam as mutações e utilizam a reação em cadeia da polimerase (PCR), foram desenvolvidos para genotiparem bovinos da raça Brahman (DENNIS et al.,2002). Além disso, é possível realizar a determinação da atividade da α -glicosidase ácida nas células mononucleares circulantes ou por biopsias musculares (MCPHEE et al.,1990).

O diagnóstico diferencial importante para a GSD II em bovinos é a intoxicação por *Castanoperмум australe*, que produz deficiência da enzima α -glicosidase ácida, gerando os mesmos sinais clínicos, porém em qualquer fase da vida do animal (REICHMANN et al.,1987).

Como toda doença autossômica recessiva, a GDSII não apresenta tratamento. Entretanto, faz-se necessário seu controle, ou seja, evitando-se o acasalamento de animais heterozigotos (JOLLY et al.,1977). É fundamental que, em propriedades onde haja animais clinicamente afetados por essa enfermidade, os animais heterozigotos sejam identificados e retirados da reprodução (HEALY et al., 1995). O teste genético para identificação de

animais heterozigotos em animais de centrais reprodutivas é importante para o controle e disseminação da doença nos rebanhos (DENNIS et al.,2002).

2.4. Síndrome miastênica congênita (CMS)

A Síndrome miastênica congênita (CMS) ou Miastenia Hereditária é uma enfermidade caracterizada pela disfunção da transmissão neuromuscular nas placas terminais motoras do músculo esquelético (HANTAI et al., 2004). Foi descrita em humanos e em animais domésticos, incluindo cães (INDRIERI et al., 1983) e gatos (TROJABORG & FLAGSTAD, 1982) e bovinos da raça Brahman (KRANER et al., 2002). Por ser uma enfermidade autoimune e caracterizada pela presença de anticorpos que visam receptores de acetilcolina em junções neuromusculares, resultando na redução do número de receptores de acetilcolina (DRACHMAN, 1994).

A CMS é definida por fraqueza muscular com piora ao exercício, e que ocorre geralmente logo após do nascimento (ZAFEIRIOU et al., 2004). Em humanos a síndrome miastênica congênita, pode ser classificada de acordo com a localização da mutação, sendo ela, pré-sináptica, sináptica ou pós-sináptica. A variação pós-sináptica é considerada a mais frequente e a pré-sináptica menos frequente. Enquanto, que a pré-sináptica comumente causa defeitos na acetiltransferase (enzima que catalisa a produção de acetilcolina), a sináptica causa defeitos na fenda sináptica da acetilcolinesterase, e a pós-sináptica, frequentemente desenvolve uma deficiência ou anormalidade cinética do receptor de acetilcolina (HANTAI et al., 2004; ENGEL & SINE, 2005).

Kraner et al. (2002) determinaram a estrutura genômica do bovino para a subunidade épsilon do receptor de acetilcolina muscular (bovCHRNE) e descreveram o defeito genético em bezerros que sofreram a síndrome miastênica congênita grave. Em bovinos da raça Brahman é causada por uma deleção de 20 pares de base (c.470del20) no gene *CHRNE*, resultando em ausência da subunidade épsilon do receptor de acetilcolina nicotínica na junção neuromuscular o que resulta em um receptor de acetilcolina afuncional e sinais clínicos de fraqueza muscular progressiva e mortalidade em bezerros jovens.

A ativação de acetilcolinesterase (AChRs) por acetilcolina (ACh) normalmente dispara um potencial de placa terminal. A margem de segurança da transmissão neuromuscular é determinada pela diferença entre a despolarização causada pelo potencial da placa terminal e o limiar de despolarização necessário para ativar os canais de sódio e dar origem a um potencial de ação propagado que resulta em contração muscular. No entanto, as mutações nos genes que codificam as várias subunidades de AChR podem não ser necessariamente mutações nulas levando à ausência da subunidade, mas podem em vez disso resultar em uma anormalidade cinética da AChR, aumentando ou diminuindo a resposta sináptica para ACh. A posição exata e a natureza da mutação são, portanto, fatores que influenciam a eventual manifestação clínica no indivíduo afetado (ENGEL & SINE, 2005).

Thompson (1998) descreveu a suspeita de quatro bezerros, na África do Sul, que apresentaram fraqueza muscular entre as três primeiras semanas de vida, e que não se mantinham em estação após alguns dias. Nos exames hematológicos, séricos e na biopsia não havia nenhuma alteração, porém, o

exame neurológico revelou uma resposta diminuída de 15% dos músculos perineais. Inibidores de acetilcolina melhoraram a condição transitoriamente, mas os animais foram submetidos a eutanásia por sinais clínicos secundários. Durante a investigação genealógica dos animais, observou-se que o pai e o avô materno eram heterozigotos para a deleção (c.470del20) no gene *CHRNE*. Após investigação do rebanho, percebeu-se que 36 animais da propriedade apresentavam pelo menos um ancestral comum (THOMPSON, 2003).

Os sinais clínicos em humanos variam amplamente. Embora a maioria esteja presente durante o primeiro ano de vida, outros só podem ser detectados muito mais tarde (ENGEL et al., 1996; BEESON et al., 1997) e variam desde fraqueza muscular ligeira tardiamente e incapacidade grave com episódios de risco de morte (ZAFEIRIOU et al., 2004). Em bezerros os principais sinais clínicos acontecem do nascimento até a quarta semana de vida e com o aparecimento de fraqueza e deterioração da força muscular ao longo de várias semanas ou meses. No entanto, há evidências de que os animais heterozigotos tenham um efeito positivo ao seu ganho de peso vivo (PV) aos 600 dias de idade, e possivelmente, maior PV também ao nascimento, aos 200 dias e aos 400 dias, deve ser a mais que 13,5 kg aos 600 dias, o que confere uma vantagem seletiva e uma tendência de que a frequência da mutação venha a aumentar na população (THOMPSON et al., 2007).

Para a confirmação do diagnóstico, testes moleculares que localiza a mutação utilizando reação em cadeia da polimerase (PCR) e como diagnóstico diferencial sugere-se outras enfermidades nas quais a transmissão de impulsos

na junção neuromuscular somática é prejudicada, dentre elas incluem a deficiência de Ca^{2+} (febre do leite), botulismo e paralisia do carrapato, nas quais a liberação de acetilcolina do terminal do axônio é inibida (RADOSTITS et al., 2000).

Por sua vez, como toda doença autossômica recessiva, a miastenia hereditária não apresenta tratamento. Portanto, medidas de controle para a doença precisam ser implementadas no Brasil para minimizar os prejuízos ocasionados pela disseminação destes alelos mutados no rebanho Brahman e em raças derivadas do Brahman no país, uma vez que a doença é letal em animais homozigotos recessivos.

3. Referências bibliográficas

ARAÚJO, C.E.T. Prevalência de portadores da mutação associada à deficiência da enzima ramificadora de glicogênio (GBED) em cavalos da raça quarto de milha. Botucatu, Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus Botucatu, Universidade Estadual Paulista. 2015. 61p.

American Brahman Breeders Association (ABBA). Disponível em: <<https://www.brahman.org/about/>> Acesso em 02 de Dezembro de 2016.

Associação Brasileira das Industrias exportadoras de carnes (ABIEC). Disponível em: <<http://www.crpbz.org.br/Home/Conteudo/15645-Perfil-da-Pecuaria-Brasileira-Relatorio-2016-da-ABIEC>> Acesso em 10 de Dezembro de 2016.

Associação dos Criadores de Brahman do Brasil (ACBB). Disponível em: <<http://www.brahman.com.br/index.php/a-historia-da-acbb.html>> Acesso em 05 Dezembro de 2016.

Associação dos Criadores de Brahman do Brasil. A História da Raça Brahman (ABCZ). Disponível em <<http://www.brahman.com.br/index.php/raca-brahman/a-historia-da-raca-brahman.html>> Acesso em 02 de Dezembro de 2016.

BIJVOET,A.G.A.,VANDECAMP,E.H.M.,KROOS,M.A.,DING,J.H.,YANG,B.Z.,VISSER,P.,BAKKER,C.E.,VERBEET,M.Ph.,OOSTRA,B.A.,REUSER,A.J.J.,VAN DER PLOEG,A.T. Generalized glycongen storage and cardiomegaly in knockout mouse model of Pompe disease. **Human Molecular Genetics**,v.8, n.1, p.53-62,1998.

CHAMPE,P.C.,HARVEY,R.A. **Metabolismo do glicogênio**. In: Bioquímica ilustrada. Cap.13, p.141-152,1996.

CHEVILLE, N.F. **Abnormal metabolic pathways**. In: Introduction to veterinary pathology.first ed.Iowa: Iowa State University Press, p.94-95,1988.

CIEPŁOCH, A., RUTKOWSKA, K., OPRZĄDEK, J., POŁAWSKA, E. Genetic disorders in beef cattle: a review. **Genes Genomics**, v.39, p.461-471, 2017.

DENNIS, J.A., MORAN, C., HEALY, P.J. The bovine α -glucosidase gene: coding region, genomic structure, and mutations that cause bovine generalized glycogenosis. **Mammalian genome**,v.11, p.206-212, 2000.

DENNIS, J.A.; Healy, P.J.; REICHMANN, K.G. Genotyping Brahman cattle for generalized glycogenosis. **Australian Veterinary Journal**, v.80, n.5, p.286-291, 2002.

DRACHMAN, D. B. Myasthenia gravis. **New England Journal of Medicine**, v.330.p.1797–1810. 1994.

ENGEL, A. G. & S. M SINE,SM.. Current understanding of congenital myasthenic syndromes. **Current Opinion in Pharmacology**, v.5.p.1–14, 2005.

ENGEL, A. G., K. OHNO, C. BOUZAT, S. M. SINE, AND R. C. GRIGGS. End-plate acetylcholine receptor deficiency due to nonsense mutations in the epsilon subunit. **Annals of Neurology**, v.40,p.810–817, 1996.

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

GIESELMANN, V. Lysosomal storage diseases. **Biochimica et Biophysica Acta**, p.103-136,1995.

HANTAI, D., P. RICHARD, J. KOENIG, AND B. EYMARD. Congenital myasthenic syndromes. **Current Opinion in Neurology**, v.17, p.539–551,2004.

HEALY, P.J. et al. Evidence of molecular heterogeneity for generalised glycogenosis between and within breeds of cattle. **Australian Veterinary Journal**,v.72, n.8, p.309-311, 1995.

HERS, H.G. α -Glucosidase deficiency in generalized glycogen storage disease (Pompe's disease). **Biochemical Journal**,v.86, p.11-16, 1963.

HUXTABLE,C.R. & DORLING,P.R. Poisoning of livestock by *Swainsona* spp.: current status. **Australian Veterinary Journal**, v.59,p.50-53,1982.

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. **Mammalian genome**, v.19, p.226-245, 2008.

INDRIERI, R. J., S. R. CREIGHTON, E. H. LAMBERT, AND V. A. LENNON. Myasthenia gravis in two cats. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.182,p.57–60,1983.

JOLLY, R.D. Screening for genetic diseases in cattle. **Australian Veterinary Journal**, v.80, n.5, p.284-285, 2002.

JOLLY,R.D.& WALKLEY S.U. Lysosomal storage diseases of animals: An Essay in Comparative Pathology. **Veterinary Pathology**,v.34,p.527-548,1997.

JOLLY,R.D., HARTLEY,W.J., PATH,F.R.C. Storage disease of domestic animals. **Australian Veterinary Journal**, v. 53,1977.

KRANER S, SIEB JP, THOMPSON PN, STEINLEIN OK. Congenital myasthenia in Brahman calves caused by homozygosity for a CHRNE truncating mutation. **Neurogenetics**,v.4, p.87–91, 2002.

KROOS, M.A. et al. The genotype-phenotype correlation in Pompe disease. **American Journal of Medical Genetics C: Seminars in Medical Genetics**, v.160, n.1, p.59-68, 2012.

LEIPOLD,H.W.,DENNIS,S.M. **Congenital defects affecting bovine reproduction**. In: Morrow, D.A. Current therapy in Theriogenology.(ed.) W.B.Saunders Company, Philadelphia, P.A. p-410-441,1980.

MANKTELOW, B. W., HARTLEY, W.J. Generalized glycogen storage disease in sheep. **Journal of Comparative Pathology**, vol.85, n.1, p139-145, 1975.

MEYDAN, H.; YILDIZ, M.A.; AGERHOLM, J.S. Screening for bovine leukocyte adhesion deficiency, deficiency of uridine monophosphate synthase, complex vertebral malformation, bovine citrullinaemia, and factor XI deficiency in Holstein cows reared in Turkey. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v.52, n.56, 2010.

MOSTAFA,I.E. A case of glycogenic cardiomegaly in a dog. **Acta Veterinaria Scandinavica**, vol. 11, p.197-208, 1970.

O'DONNELL, K. **Pompe disease- the real story**. 2009. Disponível em: pompestory.blogspot.com.br. Acesso em: 20 de abril 2017.

O'SULLIVAN, B.M. Generalised glycogenosis in Brahman cattle. **Australian Veterinary Journal**, v.57, n.5, p.227-229, 1981.

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

REICHMANN, K.G.; Twist, J.O.; Thistlethwaite, E.J. Clinical, diagnostic and biochemical features of generalised glycogenosis type II in Brahman cattle. **Australian Veterinary Journal**, v. 70, n.11, p.405-408, 1993.

REICHMANN,K.G.,TWIST,J.O.,MCKENZIE,R.A., ROWAN,K.J. Inhibition of bovine α -glucosidase by *Castenospernum australe* and its effect on the biochemical cattle. **Australian Veterinary Journal**, vol.64, n.9, 1987.

RICHARDS,R.B. , EDWARDS, J.R., COOK, R.D., et al. Bovine generalized glycogenosis. **Neuropathology and Applied Neurobiology**, vol.3, n.1, p.45-56, 1977.

SANDSTRÖM, B., WESTMAN, J., OCKERMAN, P.A. Glycogenosis of the central nervous system in the cat. **Acta Neuropathologica**, v.14, n.3, p.194-200, 1969.

SUMMERS,B., CUMMINGS,J.F., DELAHUNTA,A. **Veterinary Neuropathology**. ch.5:Degenerative diseases of the central nervous system. Mosby:St. Louis, p.208-350,1995.

THOMPSON, P. N. Suspected congenital myasthenia gravis in Brahman calves. **Veterinary Record**, v.143, p.526–529,1998.

THOMPSON PN, DENNIS JA, MERCIECA KN, HARPER CK, NEL A, BELL E, et al. Screening for two genetic diseases affecting calf survival in South African and Australian Brahman cattle. In: **Proceedings of the 10th International Symposium on Veterinary Epidemiology and Economics**, Viña del Mar, p.358, 2003.

THOMPSON PN, VAN DER WERF JHJ, HEESTERBEEK JAP, VAN ARENDONK JAM. The *CHRNE* 470del20 mutation causing congenital myasthenic syndrome in South African Brahman cattle: Prevalence, origin, and association with performance traits. **Journal Animal Science**, v.85, p.604–609, 2007.

TROJABORG, W. & FLAGSTAD, A. A hereditary neuromuscular disorder in dogs. **Muscle & Nerve**, v.5, p 30–38, 1982.

WISSELAAR, H. A. et al. Biochemical genetics of glycogenosis type II in Brahman cattle. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.190, n.3, p.941-947, 1993.

ZAFEIRIOU, D. I., M. PITT, AND C. DE SOUSA. Clinical and neurophysiological characteristics of congenital myasthenic syndromes presenting in early infancy. **Brain and Development**, v.26, p.47–52, 2004.

ZLOTOWSKI, P. et al. Glicogenose hereditária em bovinos Brahman no Brasil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.25, n.4, p.210-214, 2005.

Capítulo II

O trabalho a seguir foi redigido em conformidade com as normas da revista “Veterinary Records”

Prevalence of mutations responsible for glycogen storage disease type-II and congenital myasthenic syndrome in Brazilian Brahman Cattle

Anelize de Souza Trecenti, BVSc, MMedVet¹, André Vinhas Fernandes, BVSc¹, Danilo Giorgi Abranches de Andrade, BVSc, MMedVet¹, Andreza Pimenta-Oliveira, BVSc, MMedVet¹, Alexandre Secorun Borges, BVSc, MMedVet, PhD¹, Jose Paes Oliveira-Filho, BVSc, MMedVet, PhD^{1,*}

¹Department of Veterinary Clinical Science, São Paulo State University (UNESP), School of Veterinary Medicine and Animal Science, Botucatu. 18618681, Botucatu, São Paulo, Brazil

*Corresponding author. Department of Veterinary Clinical Science, São Paulo State University, 18618681, Botucatu, São Paulo, Brazil.

zefilho@fmvz.unesp.br

Abstract

Glycogen storage disease type II (GSD-II) and congenital myasthenic syndrome (CMS) are important autosomal recessive disorders in Brahman cattle. No study has previously evaluated the prevalence of mutations responsible for GSD II (E7, c.1057_1058delTA; and E13, c.1783C>T) or CMS (c.470del20) in Brazilian Brahman cattle. The objective of this study was to investigate the presence of these mutations in 276 hair roots from purebred Brazilian Brahman cattle and in 35 semen samples from purebred Brahman bulls that were routinely used in breeding programmes in Brazil. Of the 276 Brahman cattle tested, 7.3% were identified as heterozygous for E7. All Brahman cattle studied were homozygous for the wild-type E13 allele. The E7 mutations was identified as heterozygous in 8.6% (3/35) of the commercial semen samples, whereas the E13 mutations was not identified. The c.470del20 mutation was identified as heterozygous in 0.73% of the hair root samples, but this mutation was not present in any semen sample assessed. In summary, the E7 and c.470del20 mutations are present in the Brazilian Brahman herd, and control measures should be adopted to prevent an increase in the incidence of GSD-II and CMS in Brahman cattle in Brazil.

Keywords: Brahman cattle; congenital myasthenic syndrome; Pompe Disease, Brazil.

Introduction

Genetic disorders affecting breeds of cattle are relatively common and may be economically important in particular herds.¹ Brazil is an important country for cattle breeding for milk and meat, having one of the largest herds in the world. Brazilian livestock production is characterised by large-scale

extensive operations under grazing conditions using mainly natural mating or artificial insemination (AI) as reproductive strategies, although the use of *in vitro* embryo production (IVP) has increased each year for animals of high genetic value.² In contrast, there have only been a few studies of genetic diseases in the Brazilian cattle herd.

The glycogen storage disease type II (GSD-II), also known as generalised glycogenosis or Pompe's disease, and congenital myasthenic syndrome (CMS) are important autosomal recessive disorders.^{3 4} The GSD-II in Brahman cattle is caused by two independent mutations, c.1057_1058delTA (E7) and c.1783C>T (E13), in the gene coding the acidic α -glucosidase (GAA) enzyme.⁵ Animals homozygous for any of these two polymorphisms will produce a truncated GAA, resulting in glycogen accumulation in lysosomes. Affected individuals show progressive muscle weakness, problems with motor coordination and abnormal growth.^{6 7} Usually, this condition is progressive and animals die before 12 months of age.⁸

Congenital myasthenic syndrome (CMS) in Brahman cattle is caused by a homozygous 20 base pair deletion (c.470del20) in the gene coding for the epsilon subunit of the acetylcholine receptor (*CHRNE*).⁹ This polymorphism, when homozygous, results in a non-functional allele and the inability to produce functional adult-type nicotinic acetylcholine receptor. This, in turn, results in progressive severe muscle weakness observed either at birth or within the first month of life, which leads to death shortly thereafter.^{10 11}

Brahman cattle is a cosmopolitan breed, found in more than 70 countries around the world. In Brazil, the breed was mainly derived from American Brahman, being officially introduced in Brazil in 1994. Currently, this breed is

the second major meat breed of zebuine origin in Brazil. Although the Brazilian Brahman herd is considered the third largest Brahman herd in the world, unlike in other countries,^{3 4} no study has previously evaluated the prevalence of mutations responsible for GSD-II or CMS in Brazilian Brahman cattle. Therefore, the objective of this study was to investigate the mutation E7, E13 and c.470del20 in Brazilian Brahman cattle and commercial Brahman semen used in Brazil.

Materials and methods

A total of 276 hair root samples were collected from purebred Brahman cattle (167 females and 109 males, with ages ranging from 12-24 months) from meat farms located in four geopolitical regions of Brazil, North+Midwest (28/276), Southeast (136/276) and Southern (112/276), under a strict confidentiality agreement to ensure the anonymity of establishments, owners and animals. The sampling was randomly performed by ABCZ technicians (Associação Brasileira dos Criadores de Zebu) during the certification of animals. In addition, 35 frozen semen samples taken from purebred Brahman bulls (22 bulls from the USA, 11 Brazilian bulls, one Argentine bull and one Australian bull) and obtained from reproduction companies in Brazil were also used in this study. All procedures were approved by the Board of Ethics and Animal Experimentation of the institution (Protocol nº 048/2016 – CEUA).

Genomic DNA was purified from hair root samples using an in-house method and from semen samples using the GenElute™ Genomic Blood DNA Kit (Sigma-Aldrich®) according to the manufacturer's instructions. The DNA obtained was used to genotype the mutations c.1057_1058delTA (E7) and

c.1783C>T (E13) in the *GAA* gene and c.470del20 in the *CHRNE* gene. Two specific primer pairs were designed with Primer Express software (Applied Biosystems, Grand Island, NY) to genotype the mutations E7 (258-bp) (CGGGATCCTGGACGTGTA, AGTAGGCCCTGGTCATATTCT), and E13 (323-bp) (AGCTATCCGGTCCTTGA, GACCTGGCTCTGGACAAAC) in the *GAA* gene. The specificity of the PCR primers was evaluated in silico with the Basic Local Alignment Search Tool (National Center for Biotechnology Information/USA). The c.470del20 mutation, in the *CHRNE* gene, was genotyping using primer previously described.¹¹ Purified DNA from the hair root and semen samples was used in PCR genotyping. The PCR products were purified and sequenced. The obtained sequences were compared with the normal *Bos taurus* *GAA* or *CHRNE* gene sequences using BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

The genotypic frequencies per polymorphism were estimated separately. Prevalence estimates provided the basis for calculation of the number of heterozygous and homozygous recessive calves born annually, assuming random mating.⁴

Results

Hair root samples were collected during the year of 2,014 and all animals were apparently healthy, and no clinical signs of GSD-II or CMS were observed in animals during the sampling procedures. Of the 276 Brahman tested, 20 (7.3%; 10 females and 10 males) animals were E7 carriers (E7/N) and 256 (92.7%) were wild-type (N/N). The E7 mutation was observed as heterozygous in 9.6% (13/136) of the tested animals from the Southeast region, 5.4% (6/112)

from the Southern region and 3.6% (1/28) from the North+Midwest regions. All Brahman cattle studied were homozygous for the wild-type allele E13. Two (0.73%) Brahman cattle c.470del20 carrier, including one female from the Southern region and one male from the Midwest region. The other 274 (99.3%) Brahman cattle were homozygous for the wild-type allele of this mutation. No animal was found to be heterozygous for both mutation (E7 and c.470del20).

Considering the E7 and c.470del20 mutation frequencies and random mating, may be estimated that 7,034 E7 carriers calves and 727 c.470del20 carriers calves will be born in every 100,000 births, and 133 E7-affected calves and one c.470del20-affected calf will be born in every 100,000 births in Brazil.

Of the 35 semen samples assessed, three (8.6%) were identified as heterozygous to E7 carriers, including two bulls from the USA and one bull that was born in Brazil but was the son of parents imported from the USA. The E13 c.470del20 polymorphism was not identified in the studied bulls.

Discussion

The GSD-II and CMS are important autosomal recessive disorders in Brahman cattle herds from Australia^{3 4} and South Africa,^{4 12} and although the origin of these animals and the Brazilian herd are the same, the prevalence of these diseases in Brazil was unknown.

In the present study, the E7 carriers frequency was similar to South Africa (7.3%);⁴ and lower than Australia (12%).³ Assuming random breeding over the Australian Brahman herd, approximately 400 affected calves will be born for every 100,000 births. Because GSD-II is a fatal disease, the annual loss was predicted in 2002 to be USD \$1,035,000,³ and proportional losses might also

occur in Brazil. Unfortunately, these losses may be greater in both Australia and in Brazil because the standard practice of line breeding increases inbreeding, leading to an inevitable increase in the frequency of homozygous recessive alleles.³

The prevalence of E7 carriers was higher in the Southeast region than in the Southern and North+Midwest regions. Although the southeast region has the highest number of purebred Brahman cattle registered in ABCZ, animals heterozygous for E7 were found in all Brazilian regions studied, indicating that this polymorphism is widespread throughout Brazil. On the other hand, although the E13-GSD-II mutation provokes generalised glycogenosis in Australian Brahman cattle, it is less common and was restricted to descendants of one bull imported from the USA, which had arrived in Australia in 1982.³ This is probably why the 1783T allele was not detected in Brazilian Brahman cattle in the present study.

In the present study, the two animals identified as c.470del20 carriers were from two farms located in the Southern and Midwest regions of Brazil. The frequency of the c.470del20 carriers in Brazil was similar to South Africa.⁴ This low frequency probably does not have a significant economic impact on the Brazilian Brahman herd. However, because c.470del20 carriers are heavier at 600 days of life compared to wild-type animals, there is a selective advantage that tends to increase the frequency of the mutant allele in the population if the genotypes of bulls and/or cows are unknown.¹² This human interference may lead to artificial selection resulting in economic losses that may be difficult to compensate.¹³

The 24 imported bulls together accounted for 50,000 descendants registered in ABCZ since the introduction of the breed in Brazil (1994-2014). The two American bulls identified as E7 carriers together produced 3,000 registered offspring in the same period. Unfortunately, data about the number of descendants of the 11 Brazilian bulls used in the present study was not available. However, all commercial semen samples assessed in the present study, including the 11 Brazilian bulls, belonged to bulls that were routinely used in breeding programmes in Brazil.

Calves affected by GSD-II usually have progressive muscular weakness and ill-thrift, with a life expectancy of less than 12 months.⁷ Only one report of E7 GSD-II was described in a farm located in the Southern region of Brazil.¹⁴ However, the data of the present study, reinforce the hypothesis that affected animals (E7 GSD-II) are probably being born in Brazil and dying before weaning without having the cause of death correctly diagnosed. Additionally, non-detection of the alleles of the other two polymorphisms (E13 and c.470del20) in the cohort of the assessed bulls may allude to the lower relevance of these two mutations for the Brazilian Brahman herd compared to E7 mutation.

In summary, the E7 and c.470del20 mutations are present in Brazilian Brahman herd, and control measures, as have been adopted in Australia, should be adopted in Brazil to prevent an increase in the incidence of GSD II and CMS in Brazilian Brahman cattle.

Acknowledgments

This study was carried out at the São Paulo State University (Unesp) and in part as fulfilment of the master science thesis of AST at São Paulo State

University (Unesp), Brazil. The authors also thank Associação Brasileira dos Criadores de Zebu for collecting the samples.

Funding: This study was supported by a grant from the CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - AUX-PE-PREMIO - 432/2014) and by a grant from the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) (scholarship to AST).

Conflict of interest statement

The authors declare that there are no conflicts of interest.

References

- 1 Jolly, R.D. (2002) Screening for genetic diseases in cattle. *Australian Veterinary Journal* 80, 284-285.
- 2 Pimenta-Oliveira, A., Oliveira-Filho, J.P., Dias, A. & Gonçalves, R.C. (2011) Morbidity-mortality and performance evaluation of Brahman calves from *in vitro* embryo production. *BMC Veterinary Research* 7, 79.
- 3 Dennis, J.A., Healy, P.J. & Reichmann, K.G. (2002) Genotyping Brahman cattle for generalised glycogenosis. *Australian Veterinary Journal* 80, 286-291.
- 4 Thompson, P.N., Dennis, J.A., Mercieca, K.N., Harper, C.K. & Guthrie, A.J. (2003) Screening for two genetic diseases affecting calf survival in South African and Australian Brahman cattle. *Proceedings of the 10th International Symposium on Veterinary Epidemiology and Economics*. Reading, November 17 to 21, 2003. p 358.

- 5 Dennis, J.A., Moran, C. & Healy, P.J. (2000) The bovine alpha-glucosidase gene: coding region, genomic structure, and mutations that cause bovine generalized glycogenosis. *Mammalian Genome* 11, 206-212.
- 6 O'Sullivan, B.M., Healy, P.J., Fraser, I.R., Nieper, R.E., Whittle, R.J. & Sewell, C.A. (1981) Generalised glycogenosis in Brahman cattle. *Australian Veterinary Journal* 57, 227-229.
- 7 Reichmann, K.G., Twist, J.O. & Thistlethwaite, E.J. (1993) Clinical, diagnostic and biochemical features of generalised glycogenosis type II in Brahman cattle. *Australian Veterinary Journal* 70, 405-408.
- 8 Zlotowski, P., Gimeno, E.J., Diaz, A., Barros, R., Barros, S.S., Cruz, C.E. & Driemeier D. (2006) Lectin-histochemistry: glycogenosis in cattle. *Veterinary Research Communications* 30, 369-377.
- 9 Kraner, S., Sieb, J.P., Thompson, P.N. & Steinlein, O.K. (2002) Congenital myasthenia in Brahman calves caused by homozygosity for a CHRNE truncating mutation. *Neurogenetics* 4, 87-91.
- 10 Thompson, P.N. (1998) Suspected congenital myasthenia gravis in Brahman calves. *Veterinary Record* 143, 526-529.
- 11 Thompson, P.N., Steinlein, O.K., Harper, C.K., Kraner, S., Sieb, J.P. & Guthrie, A.J. (2003) Congenital myasthenic syndrome of Brahman cattle in South Africa. *Veterinary Record* 153, 779-781.
- 12 Thompson, P.N., van der Werf, J.H., Heesterbeek, J.A. & van Arendonk, J.A. (2007) The CHRNE 470del20 mutation causing congenital myasthenic syndrome in South African Brahman cattle: prevalence, origin, and association with performance traits. *Journal of Animal Science* 85, 604-609.

- 13 Ciepłoch, A., Rutkowska, K., Oprządek, J. & Poławska, E. (2017) Genetic disorders in beef cattle: a review. *Genes Genomics* 39, 461-471.
- 14 Zlotowski, P., Nakazato, L., Dutra, V., Barros, S.S., Gimeno, E.J., Göcks, M., Colodel, E.M. & Driemeier, D. (2005) Inherited glycogenosis in Brahman cattle in Brazil. *Pesquisa Veterinária Brasileira*. 25, 210-214.

Normas de submissão: Instruções aos autores: Veterinary Records, disponível em <http://veterinaryrecord.bmj.com/pages/authors/>

Veterinary Record (branded *Vet Record*) is the official journal of the British Veterinary Association (BVA) and has been published weekly since 1888. It contains news, opinion, letters, scientific reviews and original research papers and communications on a wide range of veterinary topics, along with disease surveillance reports, obituaries, careers information, business and innovation news and summaries of research papers in other journals.

Contributions and suggestions for all sections of the journal are welcome. Papers, short communications and scientific reviews are subject to peer review; other items are published at the discretion of the Editor.

Submissions are accepted on the understanding that they have not been published elsewhere and that they are subject to editorial revision. All published material is copyright of the BVA.

Vet Record has three sister journals with different aims and editorial criteria, these are: *In Practice*, *Veterinary Record Open* and *Veterinary Record Case Reports*. If you are unsure which of our journals to submit your manuscript to, use our decision tree to help you find the right one.

Types of technical articles considered for publication

- High-quality original studies of the efficacy of treatments or interventions, such as controlled, blinded studies with statistically significant results

- Case series with descriptions of substantial numbers of cases that can help clinicians to define diagnostic signs, including biochemical, immunological or molecular markers or other important variables
- Occasionally, single case reports, but only when they are of real novelty or potential significance, for example, novel infectious diseases such as the first case of BSE
- Substantive epidemiological studies yielding conclusions of international significance or of national significance to the UK on the aetiology, risk factors, prevalence, distribution, incidence or economic impact of disease/ill health; including public health
- Research on veterinary education, ethics and on aspects of veterinary practice and the welfare of veterinarians
- Research on animal welfare that advances standards of animal care
- Comparative medicine that contributes to human health or wider biological understanding
- Mini reviews of value for CPD
- In-depth reviews of relevant subjects
- Systematic reviews to provide the evidence-base for clinical decision-making
- Authoritative commentaries on research articles or events
- Synopses of significant research published elsewhere (not necessarily in veterinary journals), which may eventually have important veterinary applications/consequences

In all of the above, public health should be included in the scope of the coverage.

Research in Vet Record

Peer-reviewed research papers and short communications are published continuously and in full online but are not published in full in the print version of *Vet Record*. Instead, a structured summary in the print journal highlights the main findings and significance of the work, along with any factors that might affect the interpretation of the results. By presenting the information in a concise and standardised format, the findings will be readily accessible to a wider professional readership. Readers wanting more detail about the study will be able to find this by referring to the full version online.

Each summary includes the title, author details and the doi number that links to the full paper online.

Authors will be requested to provide the summary once the manuscript is at the revision stage, that is, it has been reviewed and the reviewer(s) comments have been taken into account. Please submit the summary along with the revised version. Final acceptance will not be given without it.

A summary of a **paper** will be approximately 600 words or 300 – 400 with a figure or table (depending on the size of the figure or table).

A summary for a **short communication** will be approximately 400 words. Unfortunately, no figures/tables can be included.

Both should be formatted as individual paragraphs with the following headings:

- Key findings
- Introduction (why the question addressed by the paper is important)

- Approach (including an indication of methods)
- Results
- Interpretation (including any reasons why the results should be interpreted with caution)
- Significance of findings (potential application/impact)

If authors wanting to submit papers have any question about this, these can be directed to vet.research@bmj.com. More information can be found [here](#).

Welfare and ethics

All material published in *Vet Record* must adhere to high ethical standards concerning animal welfare.

Manuscripts will be considered for publication only if the work described:

- Follows international, national and institutional guidelines for the humane treatment of animals and complies with relevant legislation.
- Has been approved by the ethics review committee at the institution or practice at which the studies were conducted where such a committee exists;
- For studies using client-owned animals, demonstrates a high standard (best practice) of veterinary care and involves informed client consent.

Before acceptance of a manuscript, to verify compliance with the above policies, the authors must:

- Confirm that legal and ethical requirements have been met with regards to the humane treatment of animals described in the study;

- Specify in the Materials and Methods section the ethical review committee approval process and the international, national, and/or institutional guidelines followed.

The Editor retains the right to reject manuscripts on the basis of ethical or animal welfare concerns. Papers may be rejected on ethical grounds if the study involves unnecessary pain, distress, suffering or lasting harm to animals, or if the severity of the experimental procedure does not appear to be justified by the value of the work presented. We ask that the work would be likely to gain approval in Britain under the Animals (Scientific Procedures) Act or equivalent regulations.

Reporting guidelines

Vet Record supports the use of reporting guidelines to ensure that studies are reported in the best possible way. The guidelines listed below should be followed where appropriate; please use these to structure your article. Completed applicable checklists, structured abstracts and flow diagrams of study subjects should be uploaded with your submission.

- CONSORT Statement (for reporting of randomised controlled trials: please use the appropriate extension to the CONSORT statement, including the extension for writing abstracts)
- REFLECT Statement (for reporting guidelines for randomised controlled trials for livestock and food safety)
- ARRIVE Guidelines (for in vivo research)
- STARD (for reporting of diagnostic accuracy studies)

- STROBE (for reporting of observational studies in epidemiology)
- Checklist for cohort, case-control, and cross-sectional studies (combined)
- Checklist for cohort studies
- Checklist for case-control studies
- Checklist for cross-sectional studies
- PRISMA (for reporting of systematic reviews)
- MOOSE (for reporting of meta-analyses of observational studies)
- STREGA (for reporting of gene-disease association studies)
- COREQ (for reporting qualitative research)

The Equator Network (Enhancing the Quality and Transparency Of health Research) provides a comprehensive list of reporting guidelines.

Datasets and supplementary material

Supplementary material, including additional figures, tables and raw data can be placed online alongside the article or placed in a digital repository, such as Dryad or Figshare, and we may request that you separate out some material into supplementary files to make the main manuscript clearer for readers. Authors are encouraged to submit figures and images in colour as there are no colour charges. We also encourage multimedia files to enhance your article.

Open Access

Authors can choose to have their article published Open Access for a fee of £1,950 (plus applicable VAT).

Article types

Research papers

Short communications

Scientific reviews

Debate

Letters and Notices

Research digest

Business and Innovation

VetRecord Careers

Product Reviews

Obituaries

News and features

What is your client thinking? column

My view column

Cover pictures

We invite authors to submit photographs or illustrations that might be used on the front cover of *Vet Record* when their paper is published. Digital images should be sent as GIF, TIFF, EPS or JPEG files at a minimum resolution of 300 dpi at an image size of 22 cm width. When submitting images please include details of who the picture should be credited to.

Research papers

Research papers should include a title of not more than 15 words; the names, qualifications and addresses of each author; an e-mail address for the corresponding author; and an abstract of not more than 200 words covering the

methods and results of the study. They should be set out in the following sections: abstract, introduction, materials and methods, results, discussion, acknowledgements, references. Clinical papers should follow a similar overall arrangement, modified appropriately. The text should be as concise as possible; the length should not exceed 4000 words. The word count excludes the title, author details, abstract, tables, figure legends, acknowledgements and references. After a manuscript has been revised, authors will be asked to submit both a 'marked copy' with changes tracked in Word and a 'clean' copy with no tracked changes. On acceptance, a one-page summary of the article will be requested and must be provided before the paper is published online (for more information click [here](#)). To submit a paper click [here](#).

Short communications

Preliminary accounts of work, short clinical reports and significant case reports for publication as short communications should follow a similar format to papers but should exclude a summary and subheadings. The title should be no more than 10 words, the text should not exceed 1000 words and only one or two figures and/or tables should be included. The word count excludes the title, author details, abstract, tables, figure legends, acknowledgements and references. After a manuscript has been revised, authors will be asked to submit both a 'marked copy' with changes tracked in Word and a 'clean' copy with no tracked changes. On acceptance a page summary of the article will be requested and must be provided before the short communication is published online (for more information click [here](#)). To submit a short communication click [here](#).

Scientific reviews

Scientific reviews are commissioned, but submitted manuscripts will also be considered. All manuscripts are peer reviewed and can be submitted here. If submitting an unsolicited manuscript, please state in the covering letter that it is a review article. Typically, we would expect articles to be around 3000 words, excluding references. If you would like to suggest a subject for a review article please email vet.research@bmj.com.

Debate

Debate articles aim to provide informed comment on topical subjects relevant to the veterinary profession; they are usually commissioned but submissions will be considered. A short title of no more than eight words, text of between 750 and 1000 words and a brief (about 40 words) introduction highlighting the argument presented should be included, along with a head and shoulders photograph of the author(s), full name, address and email address. Articles can include up to five references. Images or diagrams can be included, but may reduce the space available for the text. To submit a debate article e-mail: vet.debate@bmj.com.

Research digest

Letters on all topics related to the science, practice and politics of veterinary medicine and surgery will be considered for publication. The length should not usually exceed 400 words and may be shortened for publication. References should given when necessary. Up to two photographs can be accommodated if appropriate and tables will occasionally be allowed. Submission by e-mail is

preferred but letters submitted by post or fax will be considered. Full address details of all authors as well as an e-mail address for the corresponding author should be supplied and will be published.

Death notices should include the date of death, the deceased's full name, qualifications as would be listed in the RCVS Register, the deceased's address, the veterinary school where they qualified and their year of qualification.

To submit a letter to the editor e-mail: vet.letters@bmj.com

Research digest

Papers that have been published in other journals, that are likely to be of interest to readers of *Vet Record*, will be considered for summary in the *Vet Record's* Research Digest section. If you have a recently published paper you would like to be considered for this section, please email a PDF of the published article to: vet.research@bmj.com.

Business and Innovation

The business and innovation section aims to help keep readers up to date with some of the products and services available to the veterinary profession. Manufacturers, suppliers and service providers who wish to submit information about new products and innovations for possible inclusion in this section are encouraged to do so, and should email any news releases to: vet.innovation@bmj.com.

Vet Record Car

Vet Record Careers aims to reflect the diverse range of career options available to vets and related professionals. It includes features, tips, news and interviews on employment and educational issues, and on personal and professional development. Suggestions for articles are welcome. To send an idea email: vet.careers@bmj.com.

Product Reviews

Product reviews are published regularly in *Vet Record*. Books and other to be considered for review should be sent to:

Veterinary Record, BMJ
BMA House, Tavistock Square
London
WC1H 9JR UK

If you are unsure about the suitability of a product or have any queries about the review process please email: vet.review@bmj.com.

Obituaries

Vet Record has put together this writing guide to help you create a fitting tribute to a respected member of the profession who has passed away.

When you are writing your tribute, you may find it helpful to answer the questions below.

Contributions should be between 200 and 700 words. If you know of other people who are preparing an obituary for the same person, it would be very helpful if you could identify a single author to bring all contributions together.

- What was the person's name?
- When were they born?
- When did they die?
- What was the cause of death?
- Where did they live?
- When did they graduate and from which vet school?
- What was their field of practice?
- What were the main positions they held during their career and where?
- Did they have a special area of professional interest?
- What do you see as the person's contribution to the profession?
- What was the person like? Which of their qualities will you remember most fondly?
- Do you have any personal stories/reflections you can share?
- Who is the person survived by?
- Did they have a special pet?

We would like to include a good quality photograph of the deceased. If you have access to a high resolution digital JPEG (the larger the file size the better) we would be grateful if you would share it. Please do not send original pictures as we are aware these are often precious items and could get lost in transit.

Death notices are included in our letters and notices section.

Obituaries should be submitted to vet.obits@bmj.com

News and features

If you have information you would like considered for inclusion in the News section of *Vet Record*, or ideas for feature articles, email: vet.news@bmj.com.

What is your client thinking?

Vets in practice have to consider a multitude of options for the animals under their care over and above the clinical picture. Owner circumstances and decisions significantly influence the final care given.

These circumstances can be financial, logistical (for example, can a treatment be given feasibly) or emotional and they operate across all sectors of veterinary practice.

While vets are given a great deal of information about the clinical evidence for a treatment, there is very little out there on the owner view.

This series, by giving the owner view – both positive and negative – will help vets give clients the best experience possible.

What we need from the client.

A short piece (maximum 400 words) describing your experience. It might include the following: what is your scenario/what has happened, how did the vet's action make a difference – good or bad, what could have been done better. You should focus on one issue. If you wish to identify yourself and/or your animal(s), please do, but you can remain anonymous if you prefer. Any practice or vet information will be anonymised. Articles must be based on honest opinion and not be defamatory.

If you have pictures you would like to include, do send them, but please confirm that these are your photos or you have permission to use them.

Articles will be assessed by the series coordinator, Zoe Belshaw and the *Vet Record* editorial team. Articles accepted for publication will be edited for house style, and may be shortened. Submission of an article does not guarantee publication. To submit your article, please email vet.clientview@bmj.com.

My view

The My view column is usually commissioned, but if you have a suggestion for the column (word count 500) please email vet.opinion@bmj.com.

Plagiarism detection

BMJ is a member of CrossCheck by CrossRef and iThenticate. iThenticate is a plagiarism screening service that verifies the originality of content submitted before publication. iThenticate checks submissions against millions of published research papers, and billions of web content. Authors, researchers and freelancers can also use iThenticate to screen their work before submission by visiting www.ithenticate.com.

ANEXOS:
RESULTADOS POR ESTADO

RESULTADO POR ESTADO															
E7	ESTADO	AC	ES	GO	MG	MS	MT	PA	PR	RJ	RO	RS	SC	SP	Total Geral
HET					8			1		3	3		2	1	20
WT			1	11	1	59	9	4	7	17	33	5	65	24	256
Total Geral			1	11	1	67	9	5	7	20	36	5	67	25	276
RESULTADO POR ESTADO															
E13	ESTADO	AC	ES	GO	MG	MS	MT	PA	PR	RJ	RO	RS	SC	SP	Total Geral
WT			1	11	1	67	9	5	7	20	36	5	67	25	276
Total Geral			1	11	1	67	9	5	7	20	36	5	67	25	276
RESULTADO POR ESTADO															
CHRNE	ESTADO	AC	ES	GO	MG	MS	MT	PA	PR	RJ	RO	RS	SC	SP	Total Geral
HET								1					1		2
WT			1	11	1	67	9	4	7	21	35	5	66	25	274
Total Geral			1	11	1	67	9	5	7	21	35	5	67	25	276