

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 Δ 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 Δ 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 Δ 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 http://www.cathdb.info/version/v4_1_0/superfamily/1.10.3080.10).....	28
FIGURA 7: Poro seletivo de Cl ⁻ 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 nº 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, ressaltando 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.

REVISÃO DE LITERATURA

II. POTENCIAL DE MEMBRANA E POTENCIAL DE AÇÃO

II.A) O POTENCIAL NEGATIVO DE MEMBRANA

Desde a publicação da primeira evidência científica da natureza elétrica envolvida na condutividade do tecido nervoso e contração muscular (GALVANI, 1791), estudos contribuíram para revelar que a condução de informações ao longo do axônio é mediada pela geração ativa de um potencial elétrico, chamado de potencial de ação (MCCORMICK, 2013).

Em repouso, as células responsivas a estímulos elétricos principalmente nos tecidos nervoso e muscular, possuem maior concentração de cargas negativas na superfície citoplasmática e positivas na extracelular da membrana celular (CUNNINGHAM et al., 1971; FORSBERG et al., 1997; KANDEL, 2013; MCCORMICK, 2013).

O meio extracelular possui maior concentração de íons sódio (Na^+), cálcio (Ca^{2+}) e cloreto (Cl^-). Diferentemente, o meio intracelular é mais concentrado para ânions orgânicos e o íon potássio (K^+). Decorrente a esses gradientes, existe uma tendência de influxo para os íons Na^+ , Cl^- e Ca^{2+} , e de efluxo para o íon K^+ . Para cada íon existe um potencial de equilíbrio, em que a tendência de fluir para o meio extracelular iguala-se a tendência de fluir para o meio intracelular, caracterizando o potencial de repouso. O potencial de repouso é resultado da existência desse equilíbrio de movimento de íons entre os meios intra e extracelulares (Davies and Hanna 2001) decorrente da interação entre o gradiente osmótico e a natureza eletroquímica desses íons (CUNNINGHAM et al., 1971; FORSBERG et al., 1997; MCCORMICK, 2013).

A chegada do potencial de ação à membrana pré-sináptica da placa motora determina a liberação de acetilcolina na fenda sináptica. A acetilcolina liberada, liga-se a canais iônicos de Na^+ dependentes de ligantes (receptor nicotínico), promovendo sua abertura e o influxo de Na^+ , despolarizando a membrana celular muscular nas adjacências dos locais de sinapse. Essa despolarização, quando ultrapassa certo limiar, induz à abertura sequencial dos canais iônicos de Na^+ voltagem

dependente, ocorrendo o potencial de ação, que é propagado ao longo da membrana muscular e para invaginações especiais da membrana plasmática, os túbulos transversos, ativando canais de cálcio e desencadeando a contração muscular (Figura 1) (COOPER; JAN, 1999; CUNNINGHAM et al., 1971; MCCORMICK, 2013).

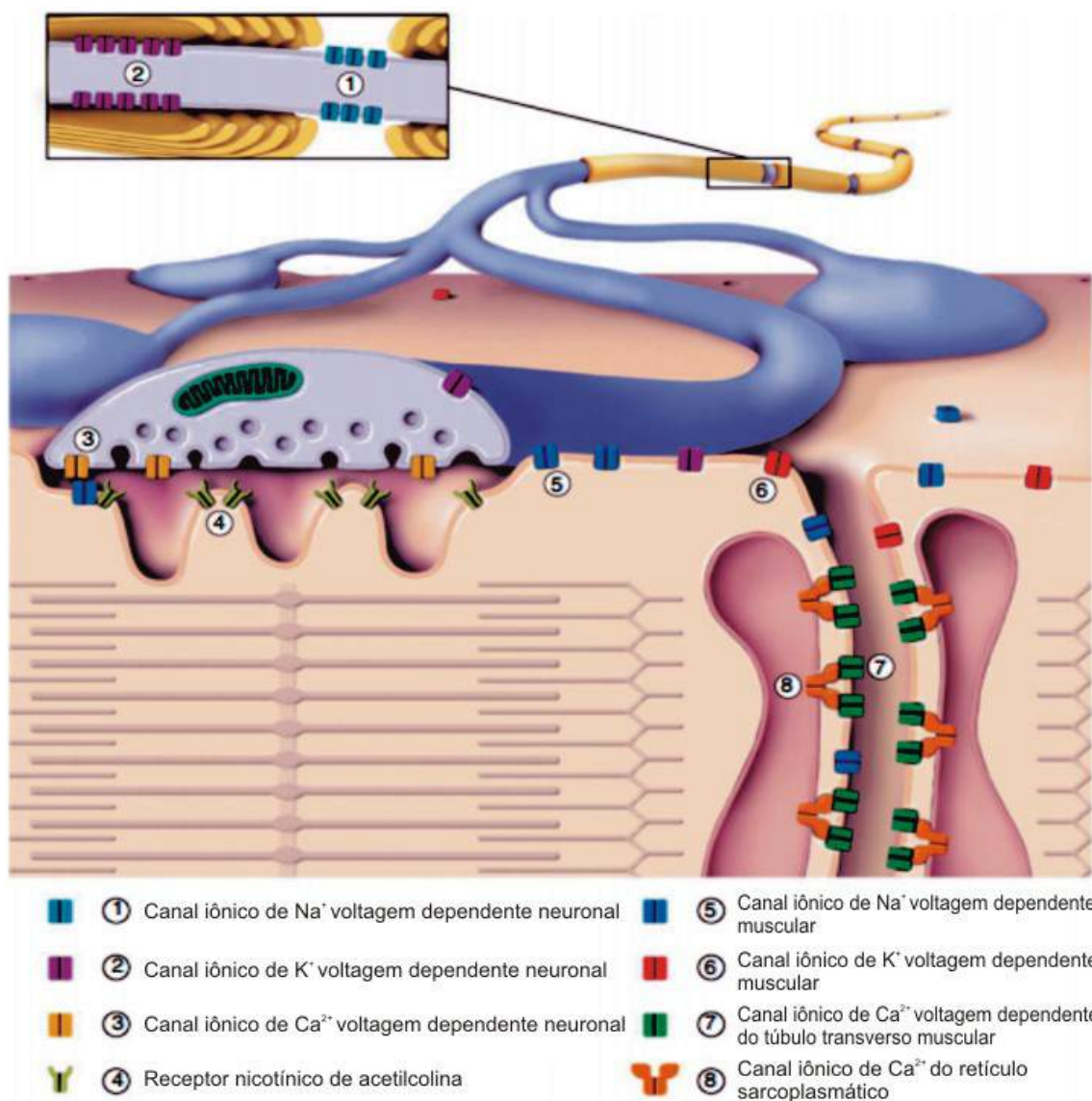


FIGURA 1: Esquema demonstrando a organização espacial dos principais canais iônicos presentes na junção neuromuscular. Fonte: adaptado de Karpati et al 2009.

Após a passagem do potencial de ação, a repolarização no tecido neuronal depende principalmente da ativação de canais de potássio, que promovem o efluxo de K⁺ tornando novamente a superfície intracelular da membrana celular mais negativa em relação à extracelular (COOPER; JAN, 1999). Diferentemente, o tecido muscular, é particularmente mais

dependente da ativação de canais de Cl^- , para que ocorra a repolarização (AROMATARIS; RYCHKOV, 2006; PALADE; BARCHI, 1977). De forma comparativa, no sarcolema, a condutância de Cl^- é quatro vezes maior que a condutância de K^+ (LEHMANN-HORN; RUDEL, 1997).

A bioeletrogênese, propriedade das células de gerarem correntes elétricas e se comunicarem umas com as outras, envolve vários tipos de moléculas e íons inorgânicos (KANDEL, 2013). Canais iônicos, são estruturas proteicas especializadas no movimento de íons através da membrana celular, que possibilitam a geração e manutenção do potencial de repouso e, eventualmente a geração de potenciais de ação (KANDEL, 2013).

Os canais iônicos são encontrados em todas as células e pertencem a uma classe de proteínas integrais da membrana celular, ou seja, são proteínas que se estendem atravessando toda a membrana celular (SILVERTHORN, 2010). Os canais iônicos dependentes de voltagem, modificam a própria conformação espacial em resposta à mudanças no potencial elétrico de membrana nas proximidades do próprio canal. A mecânica dessas mudanças na conformação é atribuída a certos aminoácidos, que, movimentam-se em associação com o campo elétrico da membrana, e dessa, forma alteram a conformação espacial do poro seletivo, consistindo em um mecanismo de abertura ou fechamento do canal iônico, permitindo ou não a passagem de íons (ARMSTRONG; BEZANILLA, 1974; BEZANILLA, 2000; KANDEL, 2013).

II.B) CLC- CANAIS DE CLORO E TRANSPORTADORES

Os canais iônicos seletivos para ânions são denominados de forma geral como canais de cloro, devido à característica de transportarem de maneira mais eficiente o íon Cl^- , e também, por esse íon ser o mais importante biologicamente dentre os ânions (KANDEL, 2013; MCCORMICK, 2013).

De acordo com a estrutura, existem três classes de canais de cloro: 1-canais de cloro dependentes de ligantes, 2-regulador de condutância

transmembranar da fibrose cística (*CFTR*) e 3-canais do tipo *CLC* (ESTÉVEZ; JENTSCH, 2002).

Defeitos moleculares nesses canais são causas de enfermidades hereditárias (BRETAG; MA, 2015), como a miotonia congênita (KOCH et al., 1992a), distrofia miotônica (CHARLET-B et al., 2002; MANKODI et al., 2001, 2002), fibrose cística (RIORDAN et al., 1989), osteopetrose (CLEIREN et al., 2001; KORNAK et al., 2001) e epilepsia (HAUG et al., 2003) .

A classe *CLC* foi inicialmente identificada em 1990, com a clonagem do canal de cloro do órgão elétrico do peixe *Torpedo marmorata*, esse canal foi então chamado de *CLC-0*, (JENTSCH; STEINMEYER; SCHWARZ, 1990). Desde então, surgiram descrições dos canais de cloro semelhantes ao *CLC-0*, constituindo assim uma grande família de canais iônicos cloro seletivos, que compartilham alta homologia e são presentes na constituição orgânica de seres vivos desde simples como bactérias, até aos mais complexos, como os seres humanos (Jentsch et al. 1999; Zifarelli and Pusch 2015).

Em mamíferos, existem nove canais de cloro tipo *CLC* descritos: *CLC-1*, *CLC-2*, *CLC-3*, *CLC-4*, *CLC-5*, *CLC-6*, *CLC-7*, *CLC-KA* e *CLC-KB* (JENTSCH et al., 1995; LEHMANN-HORN; JURKAT-ROTT, 1999). Esses canais estão presentes não somente na membrana plasmática como também na membrana de organelas intracelulares (DUTZLER, 2004; JENTSCH et al., 1995). Por homologia, podem ser agrupados em três grupos. Os membros do primeiro grupo (*CLC-1*, *CLC-2*, *CLC-KA* e *CLC-KB*) exercem sua função na membrana plasmática, já os membros do segundo (*CLC-3*, *CLC-4* e *CLC-5*) e terceiro (*CLC-6* e *CLC-7*), existem principalmente em membranas intracelulares (Figura 2) (DUTZLER, 2004; JENTSCH et al., 1995) .

O acrônimo *CLC* refere-se a **Ch**Loride **Ch**annel, e de forma estrita, é um termo errôneo, pois existem homólogos *CLC* que não são propriamente canais, pois não permitem a passagem passiva de íons (característica de um canal iônico), mas sim co-transportadores. Por exemplo, entre as proteínas da família *CLC* de mamíferos, todas as localizadas na membrana plasmática (*CLC1*, *CLC2*, *CLC-Ka*, *CLC-Kb*) são

canais iônicos de transporte passivo de Cl^- , diferentemente, as localizadas nas membranas de endossomas/lisossomas são cotransportadores de Cl^-/H^+ e, realizam o transporte do tipo contra-transporte ativo (KANDEL, 2013). Portanto nesta tese, o termo *CLC* será utilizado, entretanto, acompanhado da devida descrição, *CLC* do tipo canal ou *CLC* do tipo co-transportador.

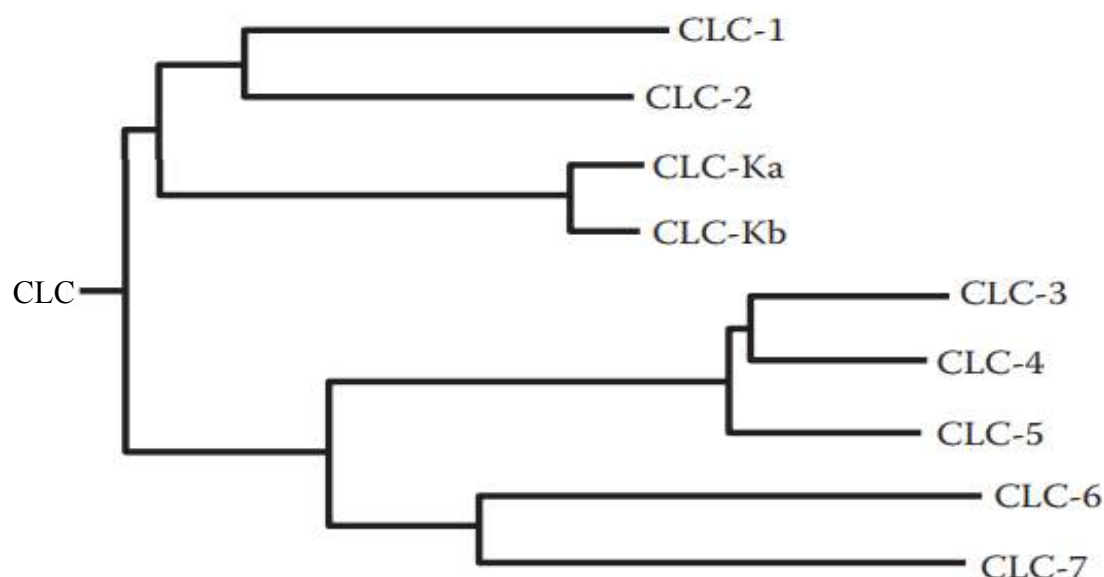


FIGURA 2: Dendrograma das proteínas *CLC* humanas. O comprimento das linhas e a distância entre os ramos, significam a similaridade entre os membros da família *CLC*, calculada pelo algoritmo ClustalW. Fonte: Adaptado de Zifarelli e Pusch (2015).

II.C) O CANAL DE CLORO *CLC-1*

O canal de cloro *CLC-1* é um homodímero e cada subunidade possui um poro seletivo para o íon de cloro que pode funcionar independente. Dessa forma, o canal de cloro *CLC-1* apresenta dois modos de funcionamento; um modo rápido, no qual os poros funcionam individualmente (*fast gates*); e um modo lento, que consiste no funcionamento dos dois poros simultaneamente (*slow gate* ou *comom gate*) (DUTZLER et al., 2002; PUSCH et al., 2001; SAVIANE; CONTI; PUSCH, 1999; WEINREICH; JENTSCH, 2001).

A estrutura primária de cada subunidade consiste de 988 e 986 aminoácidos para as principais isoformas do *CLC-1* humano e suíno, respectivamente (O'LEARY et al., 2016). A estrutura secundária de cada subunidade é caracterizada pela presença de 23 α -Hélices e 5 folha- β . Das 23 α -hélices, 17 são transmembrana, referentes as hélices B a R, 6 são citoplasmáticos, hélices A, PP(*poly-proline helix*) e mais 4 hélices que participam da formação dos domínios Cistationina- β -Sintase (CBS) (Figura 9) (FENG et al., 2010; MA et al., 2011; MACIAS et al., 2007; O'LEARY et al., 2016; PARK; CAMPBELL; MACKINNON, 2017; UNIPROTKB, 2017) . Os domínios CBS, são localizados na porção C-terminal intracelular e ao contrário dos eucariotos, não estão presentes na estrutura do *CLC* bacteriano (DUTZLER et al., 2002; ESTEVEZ et al., 2004; MARKOVIC; DUTZLER, 2007a; MEYER; DUTZLER, 2006).

Aminoácidos específicos, localizados nas α -hélices transmembrana D, F, N e R (uma região em cada α -hélice), participam da formação do poro seletivo para o íon Cl⁻, (Figura 3) (DUTZLER et al., 2002; FENG et al., 2010; PARK; CAMPBELL; MACKINNON, 2017).

Tanto em procariotos como em eucariotos, cada subunidade que compõe o canal possui uma estrutura interna repetida, de forma antiparalela. Cada metade da subunidade, na região de membrana, é estruturalmente semelhante e espelhada. Dessa maneira a α -hélice B corresponde a α -hélice J, a α -hélice C corresponde a α -hélice K, e assim sucessivamente (DUTZLER et al., 2002; FENG et al., 2010; PARK; CAMPBELL; MACKINNON, 2017) .

As hélices H, I, P, e Q são as principais responsáveis pelo contato e estabilidade entre as duas subunidades, e a hélice R conecta as regiões transmembrana (TMD) à porção C-terminal citoplasmática (CTD) (Figura 3) (DUTZLER et al., 2002; MARKOVIC; DUTZLER, 2007a; MEYER; DUTZLER, 2006) .

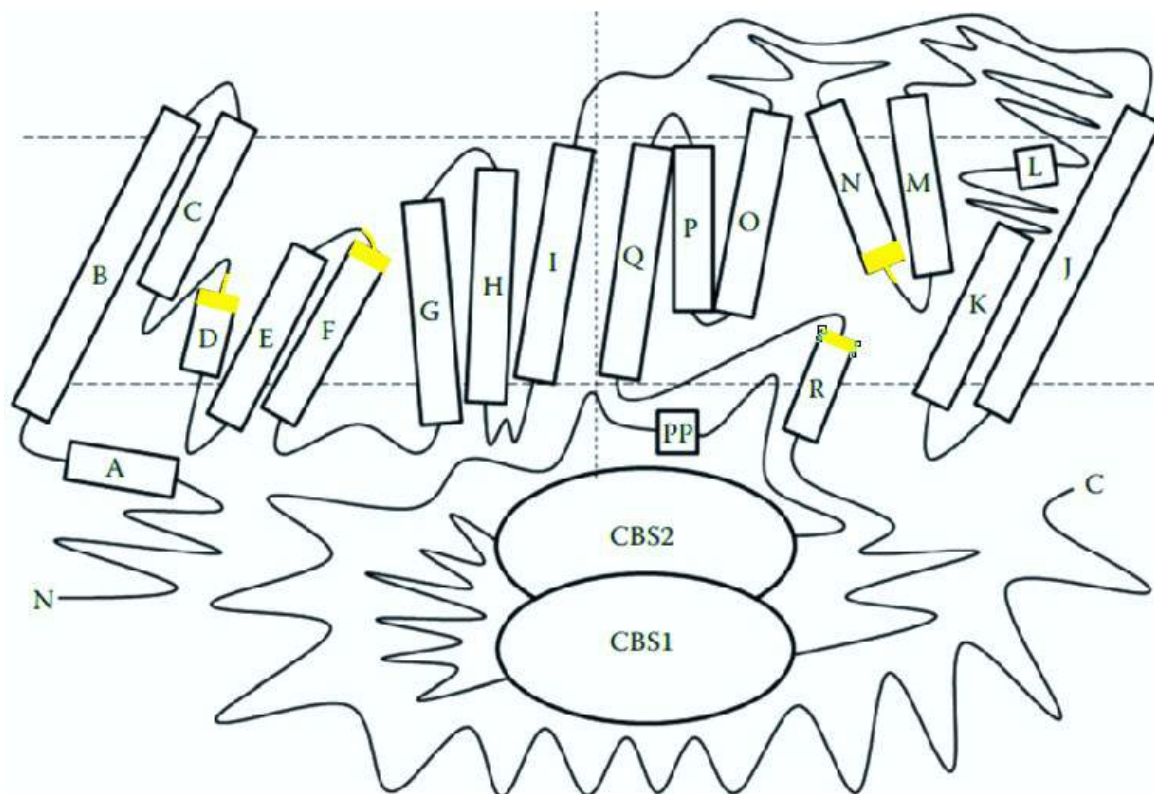


FIGURA 3: Representação esquemática bidimensional de um monômero/subunidade do cotransportador *CLC* de eucarioto-*CmCLC* (FENG et al., 2010). As linhas tracejadas horizontais representam a topologia da membrana plasmática. Os cilindros representam α Hélices, que necessariamente não atravessam a membrana plasmática, embora estejam localizadas na membrana, com exceção da hélice A e PP, que são citoplasmáticas. As marcações amarelas representam as regiões que participam do poro condutor seletivo para o íons cloreto pertencentes às hélices α -D, α -F, α -N e α -R. A longa cadeia C-Terminal está representada com seus dois domínios CBS. A linha tracejada vertical representa as metades semelhantes da mesma subunidade. Fonte: Adaptado de Bretag e Ma (2015).

As proteínas *CLC* de eucariotos possuem uma longa cadeia C-terminal citoplasmática. A importância biológica da região C-terminal é atribuída ao fato de que várias mutações nessa região são causadoras de miotonia congênita (ESTEVEZ et al., 2004; ESTÉVEZ; JENTSCH, 2002; PUSCH, 2002). Além disso, essa região possui dois domínios CBS, que ocorrem geralmente em pares e possuem funções regulatórias em vários grupos distintos de proteínas (BATEMAN, 1997; ESTEVEZ et al., 2004; JHEE; MCPHIE; MILES, 2000; PONTING, 1997; SHAN et al., 2001).

A estrutura terciária/quaternária dos canais iônicos *CLC* ainda são pouco exploradas. Dutzler et al. (2002) caracterizaram a estrutura cristalina do canal *CLC* de procariontos obtidos de *Escherichia coli*, *EcCLC* (*Protein data bank* - 1KPK) e *Salmonella enterica* Sorovar *Typhimurium*, *StCLC* (*Protein data bank* - 1KPL) utilizando a metodologia de difração de raios-X sob uma resolução de 3,5Å (DUTZLER et al., 2002). A estrutura do cotransportador *CLC* eucarioto foi inicialmente caracterizada a partir da alga vermelha *Cyanidioschyzon merolae*, *CmCLC* (*Protein Data Bank* - 3ORG) (FENG et al., 2010) (Figura 4). Recentemente Park et al. (2017) caracterizaram a estrutura do canal *BtCLC-K* obtido de bovino (*Bos taurus*) (*Protein data bank* - 5TQQ) por crio-eletromicroscopia sob uma resolução de 3,95Å (PARK; CAMPBELL; MACKINNON, 2017).

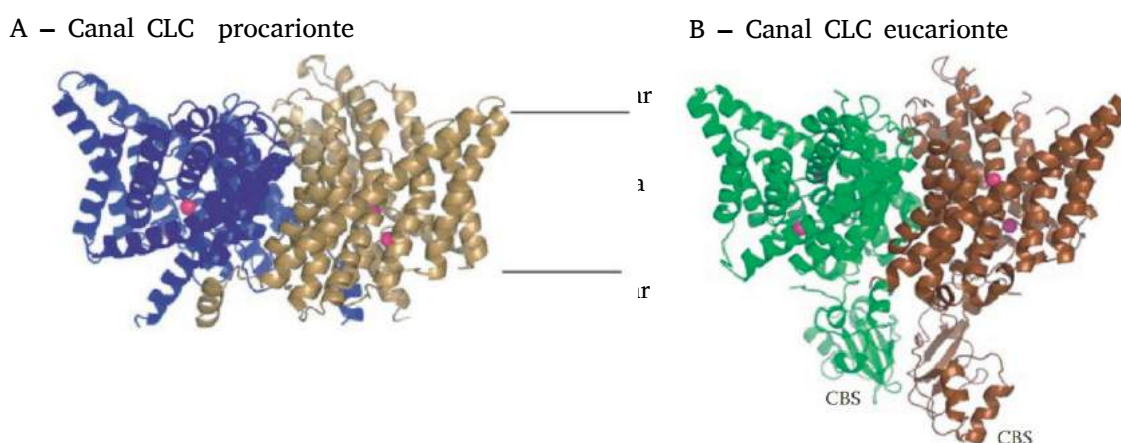


FIGURA 4 - Estrutura cristalográfica do canal (A) *EcCLC* de *Escherichia coli* (*Protein data bank* - 1KPK); e (B) *CmCLC* de *Cyanidioschyzon merolae* (*Protein Data Bank* - 3ORG). Para cada proteína, as duas subunidades são representadas em cores diferentes, e o poro seletivo do íon Cl^- é representado pelas esferas roxas. Pode-se notar a presença dos domínios CBS citoplasmáticos na proteína eucariota, diferentemente da proteína procarionte. Fonte: Adaptado de Zifarelli e Pusch (2015).

A estrutura do canal *BtCLC-K* (5TQQ) apresenta alta similaridade com o cotransportador *CmCLC* (3ORG) (PARK; CAMPBELL; MACKINNON, 2017) (Figura 5). A superfamília *CLC* (*Chloride channel* CATH: 1.103080.10) apresenta pouca diversidade estrutural (primária, secundária e terciária) quando comparada a todas as outras

superfâmias existentes no banco de dados *CATH-Protein Structure Classification Database* (CATH, 2017) (Figura 6). O co-transportador *Cm-CLC-K* e o canal *BtCLC-K* tem sido considerados modelos adequados para modelagem por homologia de co-transportadores *CLC* e canais *CLC*, respectivamente (PARK; CAMPBELL; MACKINNON, 2017). A estrutura terciária do canal *CLC-1* de eucariotos ainda não foi determinada.

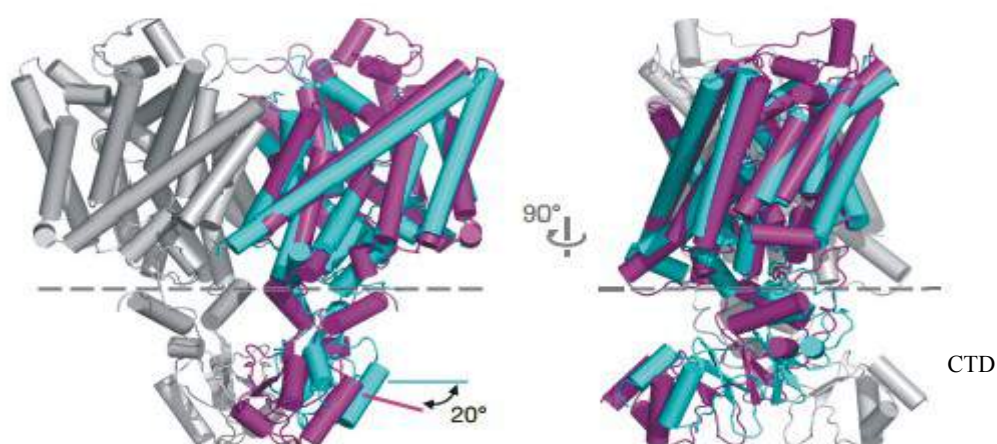


FIGURA 5: Estrutura do canal *BtCLC-K* (em cinza e magenta) sobreposta a estrutura de uma subunidade do canal *CmCLC* (em ciano) demonstrando alta similaridade. Os cilindros representam α -hélices. A linha tracejada representa os limites entre o TMD = domínios transmembrana e CTD = domínios citoplasmáticos. Fonte: Adaptado de Park *et al.* 2017.

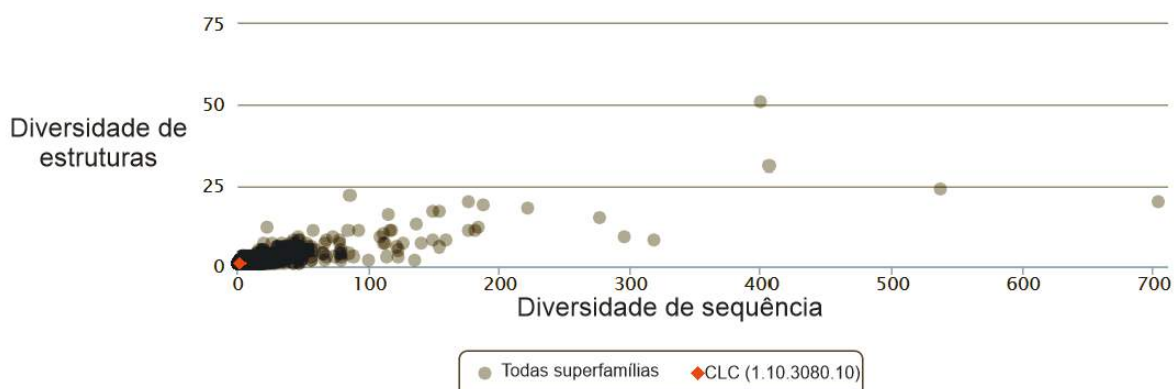


FIGURA 6: Gráfico de distribuição das superfâmias de proteínas existentes no banco de dados CATH, em função da diversidade estrutural e da diversidade de seqüências. Note que a a superfâmia *CLC* apresenta menor variação tanto estrutural quanto em seqüência, quando comparado a maioria das superfâmias. Fonte: Adaptado de CATH 2017 (disponível em http://www.cathdb.info/version/v4_1_0/superfamily/1.10.3080.10).

Nos canais *CLC*, a via de passagem para o íon Cl^- tem a forma de uma ampulheta, com vestibulos largos nas extremidades interna e externa e com uma região central do poro seletivo estreita de apenas 12Å de comprimento. Tanto em procariotos como em eucariotos, esse poro seletivo é formado por três regiões aminoterminais conservadas das α -hélices D, F e N e ainda, um aminoácido pertencente à α -hélice R (ESTÉVEZ; JENTSCH, 2002; FENG et al., 2010; PARK; CAMPBELL; MACKINNON, 2017; ZIFARELLI; PUSCH, 2015). Nessa via de passagem foram identificados três sítios seletivos de ligação para o íon Cl^- , externo (S_{ext}), central (S_{cen}) e interno (S_{int}). No canal *EcCLC* foram identificados somente os sítios S_{cen} e S_{int} , já para o co-transportador *CmCLC* foram identificados os sítios S_{ext} e S_{int} , essa variação é justificada pelos diferentes posicionamentos dos resíduos de Glutamato E148 ou E210 respectivamente (FENG et al., 2010; PARK; CAMPBELL; MACKINNON, 2017; ZIFARELLI; PUSCH, 2015). Para o canal *BtCLC-K*, foram identificados os sítios S_{cen} e S_{int} (PARK; CAMPBELL; MACKINNON, 2017) (Figura 7). Apesar dessas diferenças entre os sítios de ligação para o íon Cl^- , um resíduo de Tirosina (Tyr 520 em *BtCLC*) está posicionado essencialmente na mesma localização, cuja cadeia lateral é atribuída a função de interagir com o íon Cl^- no sítio S_{cen} , é provavelmente um elemento altamente conservado e está presente em várias estruturas de diferentes proteínas *CLC*, tanto canais como cotransportadores (DUTZLER et al., 2002; DUTZLER; CAMPBELL; MACKINNON, 2003; FENG et al., 2010; GRADOOGNA et al., 2012; JAYARAM et al., 2011) (Figura 7).

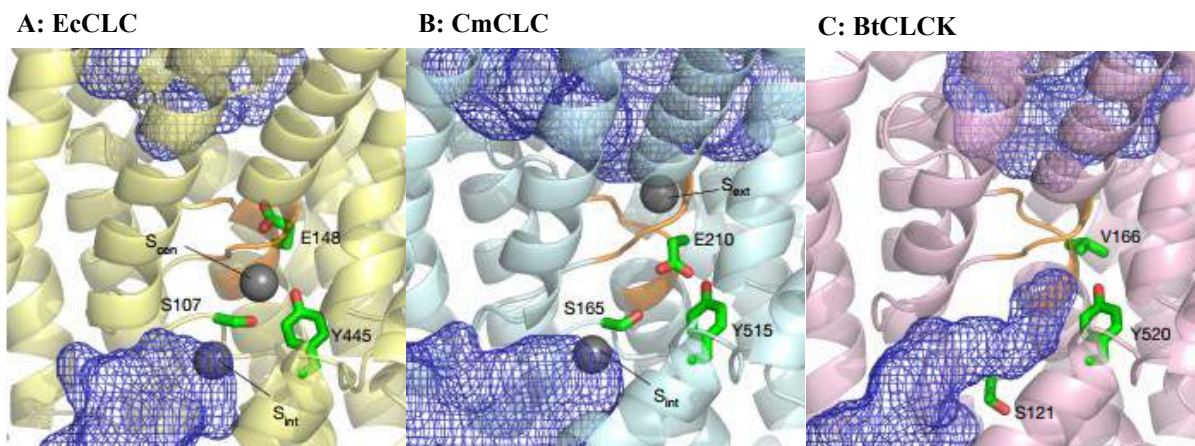


FIGURA 7: Poro seletivo de Cl^- para o canal *EcCLC* (A), o cotransportador *CmCLC* (B) e o canal *BtCLCK* (C). As cadeias laterais de Glutamato (E148 ou E210), Valina (V166), Serina (S107, S165 ou S121) e Tirosina (Y445, Y515 e Y520) estão representadas em bastões. Para *EcCLC* (A) e *CmCLC* (B) os sítios de ligação de Cl^- estão indicados como esferas cinzas. Pode-se notar a diferença na disposição dos resíduos de Glutamato E148 e E210, modificando os sítios de ligação. Pode-se também notar a presença dos resíduos de Tirosina em posições conservadas nos três canais. Fonte: Adaptado de Park *et al.* (2017).

II.D) O GENE CODIFICADOR *CLCN-1*

Em eucariotos, o canal *CLC-1* é codificado pelo gene *CLCN-1*, que apresenta alta homologia desde vertebrados *euteleostomi* (NCBI, 2017; O'LEARY et al., 2016). De acordo com informações disponíveis no banco de dados *Reference sequence* (RefSeq) do *National Center for Biotechnology Information* - NCBI, a sequência do pré RNA *CLCN1* humano (ID: 1180), está localizado no cromossomo 7, possui 35879 bp de tamanho (NCBI *Reference Sequence*: NG_009815.1), a sequência codificante (mRNA) possui 3093 pb (NM_000083.2) divididos entre 23 éxons codificantes para 988 aminoácidos (O'LEARY et al., 2016). Entretanto, pode-se verificar que cinco variantes de transcritos (*splicing* alternativo) para o *CLCN-1* e quatro isoformas da proteína *CLC-1* estão disponíveis no RefSeq (Tabela 1)

TABELA 1: Variantes de transcritos do *CLCN-1* e isoformas do *CLC-1* humano.

Trasncrito s	Código de acesso	Númer o de éxons	Tamanho do RNAm (pb)	Isoforma da proteína	Código de acesso	Tamanho- aminoácios
1	NM_000083. 2	23	3093	1	NP_000074.2	988
X1	XM_0170117 39.1	20	2822	X1	XP_0168672 28.1	846
2	NR_046453.1	22	2946	*	*	*
X2	XM_0170117 40.1	20	2798	X2	XP_0168672 29.1	838
X3	XM_0115157 82.2	13	1845	X3	XP_0115140 84.1	570

*Esse trasncrito é considerado não codificante, e candidato ao mecanismo *nonsense-mediated mRNA Decay*.

Também de acordo com informações disponíveis no banco de dados *Reference sequence* (RefSeq) do NCBI, a sequência do gene *CLCN1* suíno (Gene ID: 100520812) está localizado no cromossomo 18, a sequência de DNA genômico possui 38991 bp de tamanho (NCBI Reference Sequence: NC_010460.4), a sequência codificante (mRNA) possui 4892 pb (XM_021078561.1) divididos entre 23 éxons codificantes para 986 aminoácidos (XP_020934220.1). Entretanto, pode-se verificar que duas variantes de transcritos (*splicing* alternativo) para o *CLCN-1* codificantes respectivamente para duas isoformas da proteína *CLC-1*, estão diponíveis no RefSeq (Tabela 2) (O'LEARY et al., 2016).

TABELA 2: Variantes de transcriptos do *CLCN-1* e isoformas do *CLC-1* suíno.

Variante	Código de acesso	Número de éxons	Tamanho (pb)	Isoforma	Código de acesso	Tamanho (aminoácios)
X1	XM_0210785 61.1	23	4822	X1	XP_020934220 .1	986
X2	XM_0210785 62.1	21	5561	X2	XP_020934221 .1	870

II.E) ENFERMIDADES ASSOCIADAS AOS *CLCs*

Mutações nos genes codificadores dos canais/cotransportadores de cloro podem provocar diversas enfermidades descritas em humanos, que

podem estar relacionadas ao músculo esquelético, rins, pulmões, glândulas sudoríparas, tecido ósseo e cerebral. O termo canalopatias, tem sido proposto como uma referência para a fisiopatologia destas doenças relacionadas ao funcionamento inadequado de canais iônicos (Fontaine et al., 1990).

Os canais e co-transportadores de cloro do tipo *CLC* estão envolvidos com várias funções fisiológicas tais como: a estabilização do potencial da membrana; regulação do volume celular opoente à osmolaridade do meio extracelular; controle dos potenciais de repouso nas fibras musculares e nos neurônios, exercido majoritariamente pelo *CLC-1* e *CLC-2* respectivamente, ou ainda, relação com o transporte de cloreto de sódio (NaCl) nos rins, exercido pelos *CLC* do tipo *CLC-KA* e *CLC-KB* (ESTEVEZ et al., 2001; KOCH et al., 1992a; SIMON et al., 1997). Portanto, mutações nos genes codificadores dessas proteínas do tipo *CLC*, causam várias enfermidades hereditárias, por exemplo, defeitos no *CLC-1* causam miotonia congênita (KOCH et al., 1992a); no *CLC-5* causam a síndrome de *Dent* (LLOYD et al., 1996); no *CLC-7* causam osteopetrose recessiva tipo IV (KORNAK et al., 2001) e dominante tipo II (CLEIREN et al., 2001); no *CLC-KB* causam síndrome de Bartter tipo III (SIMON et al., 1997) e tipo IV (ESTEVEZ et al., 2001).

II.F) CANALOPATIAS MUSCULARES

Quando defeitos surgem nos canais iônicos dependentes de voltagem do músculo esquelético, o fenótipo resultante é o de uma canalopatia muscular hereditária (MEOLA et al., 2003). As distintas síndromes clínicas, relacionadas às canalopatias, podem ser compreendidas com base nas alterações específicas que as mutações produzem na atividade do canal iônico acometido (COOPER; JAN, 1999) . Por exemplo, mutações no gene codificador do canal de potássio muscular, dão origem a síndromes caracterizadas por paralisia muscular periódica, arritmias cardíacas graves e alterações esqueléticas (síndrome de Andersen) (HOFFMAN, 1995; JURKAT-ROTT; LEHMANN-HORN, 2005a).

Mutações relacionadas aos canais de cálcio da musculatura esquelética, dão origem a paralisias musculares periódicas e hipertemia malignas (PARK; CAMPBELL; MACKINNON, 2017).

Enfermidades causadas por mutações no gene que codifica a subunidade alfa do canal de sódio (*SCN4A*) do músculo esquelético, incluem: paralisia periódica hipercalêmica, miotonia agravada pelo potássio e paramiotonia congênita, essas 3 enfermidades também compartilham o sinal clínico de miotonia (HOFFMAN, 1995; MANKODI et al., 2002).

III. ENFERMIDADES MIOTÔNICAS

III.A) DEFINIÇÃO E CLASSIFICAÇÃO

A miotonia decorre de um estado de hiperexcitabilidade da fibra muscular caracterizando-se como um sinal clínico de relaxamento tardio do músculo esquelético após contração voluntária (miotonia de ação), estímulo mecânico (miotonia de percussão) ou estímulo elétrico. Durante esse relaxamento tardio do músculo esquelético, pode-se verificar a atividade elétrica repetitiva das fibras musculares na eletromiografia. As doenças que compartilham o sinal clínico de miotonia são chamadas de doenças miotônicas (BARCHI, 1994; PTACEK; JOHNSON; GRIGGS, 1993; VITE et al., 1999).

As doenças miotônicas são classificadas como doenças musculares primárias e, compõem um grupo heterogêneo de doenças que compartilham a característica clínica de miotonia (WHO-Grupo G-71.1), esse grupo pode ser dividido em miotonias distróficas (MD) e não distróficas (MND) (HAHN; SALAJEGHEH, 2016; KARPATI et al., 2010; WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2016).

Embora é relatado em humanos, que doenças miotônicas podem possuir origem adquirida, por exemplo, devido ao uso de hipocolesterolêmicos como o dizacolesterol (ARGOV; MASTAGLIA, 2009) ou relacionada às neoplasias (RANA et al., 2012), os defeitos moleculares de origem hereditária constituem a principal causa de enfermidades miotônicas (MATTHEWS et al., 2010).

III.B) MIOTONIAS DISTRÓFICAS

As MDs são principalmente caracterizadas por possuírem características musculares progressivas e degenerativas além de manifestações multissistêmicas. As principais características musculares das MDs são a fraqueza e a degeneração verificada ao exame histopatológico. Os sinais clínicos multissistêmicos frequentes são catarata, defeitos cardíacos, atrofia gonadal, e alterações neuropsiquiátricas. De forma contraditória, as MDs podem transcorrer sem a presença o sinal de miotonia (DAY et al., 2003; FACENDA-LORENZO et al., 2013; GHAREHBAGHI-SCHNELL et al., 1998).

As MDs são classificadas em dois tipos, a Miotonia Distrófica tipo 1 - DM1 ou *Steinert's Disease* que é causada por mutações no gene *DMPK* (BROOK et al., 1992) e a Miotonia Distrófica tipo 2-DM2 que é causada por mutações no gene *CNBP* (RANUM et al., 1998; RICKER et al., 1999). Acredita-se que esses genes, possuem funções de comunicação entre células e regulação da expressão de outros genes (BROOK et al., 1992; RANUM et al., 1998; RICKER et al., 1999).

Nas MDs, a miotonia não é causada por mutações nos genes *SCNA4* ou *CLCN1*, entretanto alguns estudos apontam que o defeito molecular das MDs tipo 1 e 2 interferem com a produção de várias proteínas, inclusive o *CLC1* (ESTÉVEZ; JENTSCH, 2002; ZIFARELLI; PUSCH, 2007, 2015).

III.C) MIOTONIAS NÃO DISTRÓFICAS

As MNDs são caracterizadas por disfunções nos canais iônicos presentes majoritariamente no músculo esquelético (Mankodi e Thornton, 2002). Nas MNDs além do sinal clínico de miotonia geralmente ocorrem hipertrofia e fraqueza muscular. Ao contrário das MDs, a fraqueza muscular não é progressiva e o exame histopatológico de tecido muscular geralmente não demonstra anormalidades (TRIP et al., 2009).

As principais causas de miotonias hereditárias são as miotonias não distróficas, essas estão relacionadas a defeitos moleculares nos canais

iônicos seletivos para Na^+ e Cl^- (COOPER; JAN, 1999; HOFFMAN, 1995; JURKAT-ROTT; LEHMANN-HORN, 2005b). Portanto as MNDs podem ser relacionadas a defeitos moleculares no canal iônico de cloro da musculatura esquelética (*CLC*), como a miotonia congênita, e a defeitos moleculares no canal de sódio muscular (*SCN4*), como a Paramiotonia Congênita, Paralisia Periódica Hipercalemica, Miotonia Flutuante, a Miotonia Permanente e a Miotonia responsiva à acetazolamida; essas três últimas, podem ser agrupadas ainda em Miotonias Agravadas pelo Potássio (HEATWOLE; STATLAND; LOGIGIAN, 2013; HOFFMAN, 1995; MATTHEWS et al., 2010).

As diferenças entre essas etiologias podem ser evidenciadas devido à alterações no *CLC-1* geralmente transcorrem com a presença do fenômeno *warm-up* e sem a presença de dor. O fenômeno *warm up* refere-se à melhora dos sinais clínicos, principalmente a própria miotonia, quando a atividade muscular é mantida. Já as miotonias causadas por alterações no *SCN4* são caracterizadas pela piora nos sinais clínicos conforme se continua a atividade física, esse sinal clínico é conhecido como miotonia paradoxal e ocorre principalmente na enfermidade que leva o nome dessa manifestação, a Paramiotonia Congênita. Outros sinais clínicos encontrados principalmente em humanos são frequentemente verificados pacientes com miotonia decorrente de alterações no *SCN4*, como a presença de dor, miotonia palpebral, piora da miotonia induzida pelo frio e início precoce dos sinais clínicos (HEATWOLE; STATLAND; LOGIGIAN, 2013; HOFFMAN, 1995).

Mutações no *SCN4A* produzem um estado de hiperexcitabilidade da fibra muscular, devido à alterações que ocasionam ganho de função nos canais seletivos para Na^+ , e dessa forma, ocorre atraso na inativação desses canais após um evento de potencial de ação. Esse atraso permite que pequenas correntes de despolarização persistam, e assim, aproxima-se o potencial de repouso da membrana para o limite de despolarização (HAYWARD; BROWN; CANNON, 1996; MITROVIĆ et al., 1995). Portanto defeitos no *SCN4A*, podem causar miotonia por uma tendência dos canais se manterem abertos por mais tempo após a despolarização, nesse caso, o sódio residual que entra através destes canais, reinicia repetidamente o

ciclo de despolarização de membrana. Já no caso de mutações no canal de cloro, ocorre miotonia devido à redução da quantidade de íon cloro, que entra na célula muscular para repolarizar a membrana celular (COOPER; JAN, 1999). Na Tabela 3, estão sumarizadas as principais doenças musculares hereditárias (MDs e MNDs) que compartilham o sinal clínico de miotonia, e as principais características que as diferenciam.

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.

GRUPO	DOENÇA	PADRÃO DE HERANÇA	GENE AFETADO	TIPO DE MIOTONIA	FRAQUEZA MUSCULAR	FATOR DESENCADEANTE	CARACTERÍSTICAS ADICIONAIS
MDs	DM1	D	<i>DMPK</i>	M	++	-	Sinais sistêmicos
	DM2	D	<i>CNBP</i> (<i>ZNF9</i>)	M	++	-	Sinais sistêmicos
MNDs	Thomsen	D	<i>CLCN1</i>	M	+	Exercício após repouso	Hipertrofia muscular
	Becker	R	<i>CLCN1</i>	M	+	Exercício após repouso	Hipertrofia muscular
	PMC	D	<i>SCN4A</i>	P	+*	Frio	Mais sensível ao frio
MC	HYPP	D	<i>SCN4A</i>	P,M ou -	+	K ⁺ , descanso após exercício	Hipercalemia*
MNDs	MF	D	<i>SCN4A</i>	M	+	K ⁺	Reincidivas
	MP	D	<i>SCN4A</i>	M	+	K ⁺	Rigidez muscular persistente
	PAM	MRA	D	<i>SCN4A</i>	M	+	K ⁺

MDs=Miotonias distróficas, DM1=Miotonia distrófica tipo1, DM2=Miotonia distrófica tipo 2, MNDs=Miotonias não distróficas, MC=Miotonia congênita, PAM= Miotonias agravadas pelo potássio, PMC=Paramiotonia Congênita, HYPP=Paralisia periódica hipercalemica, MF=Miotonia flutuante, MP=Miotonia permanente, MRA=Miotonia responsiva a acetazolamida, D=Dominante, R=Recessivo, M=Miotonia, P-Paramiotonia, - = ausente, + = presente, ++ = presente e progressiva, * = pode estar ausente. Fonte: Adaptado de Hahn e Salajegheh 2016.

III.D) DIAGNÓSTICO DAS ENFERMIDADES MIOTÔNICAS

A obtenção do histórico médico detalhado permite ao clínico que ele verifique diferenças preliminares, como o carácter hereditário ou adquirido, e algumas características indicativas de alguma canalopatia muscular (BAROHN; DIMACHKIE; JACKSON, 2014).

O exame físico permite evidenciar diferenças entre os tipos de miotonia, principalmente entre as MDs e as MNDs, sinais clínicos como fraqueza progressiva, distrofia muscular, hipertrofia muscular e outros sistemas envolvidos são determinantes para a caracterização (BAROHN; DIMACHKIE; JACKSON, 2014a; NONAKA; SATOYOSHI, 1992; PTACEK; JOHNSON; GRIGGS, 1993).

Em humanos com suspeita de miotonia, alguns testes clínicos podem ser realizados como: solicitar ao paciente que feche a mão ou olhos com firmeza e verificar a dificuldade e o tempo necessário quando tenta abri-los, testes de força muscular (MEDICAL RESEARCH COUNCIL, 1986), e a percussão muscular que evidencia a miotonia (BAROHN; DIMACHKIE; JACKSON, 2014a; HILTON-JONES; KISSEL, 2010). Em animais, é possível verificar a presença de miotonia lingual. Deve-se percutir a musculatura e verificar se ocorre a miotonia, a formação de sulcos musculares decorrentes da rigidez (*dimple*) e o tempo em que a miotonia permanece presente. Também é importante verificar a presença de decúbito decorrentes da miotonia de vários grupos musculares simultaneamente. Essa situação normalmente acontece quando os animais são estimulados subitamente após um período de repouso (*startle response*) (COOPER; JAN, 1999; HOFFMAN, 1995; JURKAT-ROTT; LEHMANN-HORN, 2005b).

A miotonia também deve ser avaliada quanto a presença/ausência de dor, piora ou não da miotonia quando ocorre exposição ao frio, e principalmente quanto ao tipo de miotonia, se é paradoxal ou ocorre o fenômeno *warm-up*, dessa forma pode-se direcionar qual tipo mais provável de canal iônico acometido para os canais *SCN4* ou *CLC1* respectivamente (BAROHN; DIMACHKIE; JACKSON, 2014b).

III.E) HEMATOLOGIA, BIOQUÍMICA SÉRICA E HISTOPATOLOGIA

Em pacientes acometidos por enfermidades miotônicas, alterações nos valores de hemograma e bioquímica sérica não são consistentes e específicos para o tipo de enfermidade. Valores abaixo da referência para os níveis de albumina e contagem leucócitos, assim como aumento dos níveis de hemoglobina, gama glutamil transferase (GGT), lactato desidrogenase (LDH) e creatinoquinase (CK) podem ser verificados em pacientes com DM1. Valores inferiores ao normal dos níveis e IgG e contagem de linfócitos, e também, aumento nos valores de CK, colesterol total, LDH e aspartato amino transferase (ALT) podem ser encontrados em pacientes com DM2. As MNDs geralmente não são relacionadas com alterações de hemograma e bioquímica sérica, entretanto pode ser verificado aumento de CK, por exemplo nos casos de Paralisia Periódica Hipercalêmica, em que os níveis de CK como de potássio sérico podem estar aumentados, mas geralmente, durante as crises (HEATWOLE et al., 2011, 2006; HEATWOLE; STATLAND; LOGIGIAN, 2013; PORTARO et al., 2015).

Embora não contribua para a diferenciação entre os subtipos de MNDs, o exame histopatológico é útil para a diferenciação entre as MDs e MNDs, respectivamente, pela presença ou não de anormalidades (TRIP et al., 2009). Ao exame histopatológico rotineiro (H&E, PAS, Gomori), o tecido muscular de humanos acometidos por miotonia congênita apresentam pequena quantidade de fibras do tipo IIB, reações oxidativas normais e fibras musculares com núcleos periféricos. Nas miotonias distróficas existe uma distribuição de fibras tipo I e tipo II de forma heterogênea em quantidade e tamanho, e também o posicionamento central dos núcleos, as fibras musculares podem ainda apresentar sinais de degeneração, fagocitose e necrose (COOPER; JAN, 1999; HOFFMAN, 1995; JURKAT-ROTT; LEHMANN-HORN, 2005a). Embora não sejam definitivas para o diagnóstico, técnicas especiais podem demonstrar alterações musculares em indivíduos acometidos por miotonia congênita, por exemplo maior intensidade de coloração das fibras musculares por vermelho alizarina (MANKODI et al., 2002; WHEELER et al., 2009) .

III.F) ELETROMIOGRAFIA

O exame de eletromiografia (EMG) é determinante no diagnóstico das enfermidades miotônicas. Após a inserção do eletrodo no músculo, resultados positivos são caracterizados por séries de potenciais de ação espontâneos, ondas positivas ou potenciais de fibrilação que diminuem em frequência e amplitude. Esses potenciais espontâneos, verificados no EMG de um paciente miotônico, são chamados de descargas miotônicas. A frequência dessas descargas pode variar de 20 a 80 HZ, e as amplitudes variam de 10 μ V a 1mV, o som produzido dessas descargas é característico sendo frequentemente descrito como o som produzido por um avião de bombardeio - *diver bomb* (KIMURA, 1989; PRESTON; SHAPIRO, 1998).

Durante o EMG, algumas informações adicionais específicas podem ser utilizadas para verificar a existência de anormalidades características de enfermidades miotônicas, por exemplo, a diminuição ou o aumento das descargas miotônicas verificadas durante o EMG são relacionados com o fenômeno *warm-up* ou a miotonia paradoxal, respectivamente (FOURNIER et al., 2004; KIMURA, 1989; PRESTON; SHAPIRO, 1998).

Existem enfermidades miotônicas que são caracterizadas clinicamente e positivas ao EMG, entretanto, existem miotonias que só são verificadas ao EMG. Uma abordagem sistemática para diferenciar as enfermidades miotônicas, consiste em classificar inicialmente o paciente em uma de três categorias a seguir (HEATWOLE; STATLAND; LOGIGIAN, 2013; MILLER, 2008):

Categoria1 - Miotonia positiva sob aspectos clínicos e EMG positivo.

Categoria2 - Miotonia negativa sob aspectos clínicos e EMG positivo.

Categoria3- Presença de outros sinais clínicos que ocorrem nas enfermidades miotônicas, mas sem a presença do sinal clínico de miotonia e também com EMG negativo.

Categoria 1

Contém somente miotonias decorrentes de causas primárias, ou seja, a causa está relacionada a estruturas constitutivas do tecido muscular, e são caracterizadas por evidência clínica e eletromiográfica de miotonia. As MDs e as MNDs participam dessa categoria (HEATWOLE; STATLAND; LOGIGIAN, 2013; KIMURA, 1989; PRESTON; SHAPIRO, 1998) .

Categoria 2

Caracterizada por EMG positiva para descargas miotônicas, entretanto, com ausência de sinais clínicos. Essa categoria abrange uma grande variedade de enfermidades, como a Doença de Pompe, Hipertermia Maligna, Hipotireoidismo, e Polimiosite (PRESTON AND SHAPIRO 1998; KIMURA 1989; C. R. HEATWOLE, STATLAND, AND LOGIGIAN 2013). Além dessas enfermidades, alguns medicamentos podem interferir no equilíbrio elétrico da membrana muscular, e assim, ocasionando a miotonia verificada ao EMG, embora sem a evidência de sinais clínicos. Portanto, é importante associar o resultado do EMG com o histórico de uso de medicamentos, como colchicina, propranolol, fenoterol, terbutalina, diazocholesterol, e ciclosporina (PRESTON AND SHAPIRO 1998; KIMURA 1989).

Categoria 3

Sinais clínicos como fraqueza, “câimbras”, ou espasmos que não consistem propriamente miotonia, mas podem ser confundidos com essa, caracterizam a categoria 3. Dessa forma pacientes devem ser criteriosamente avaliados sob aspectos clínicos, EMG e hereditários de modo a possibilitar a exclusão de qualquer síndrome miotônica (HEATWOLE; STATLAND; LOGIGIAN, 2013; KARPATI et al., 2010; KIMURA, 1989; PRESTON; SHAPIRO, 1998).

Considerando portanto, o tipo de categoria, o resultado histopatológico e os sinais clínicos específicos que podem estar presentes nas enfermidades miotônicas, pode-se direcionar o diagnóstico (Figura 8) (MANKODI et al., 2002; WHEELER et al., 2009) .

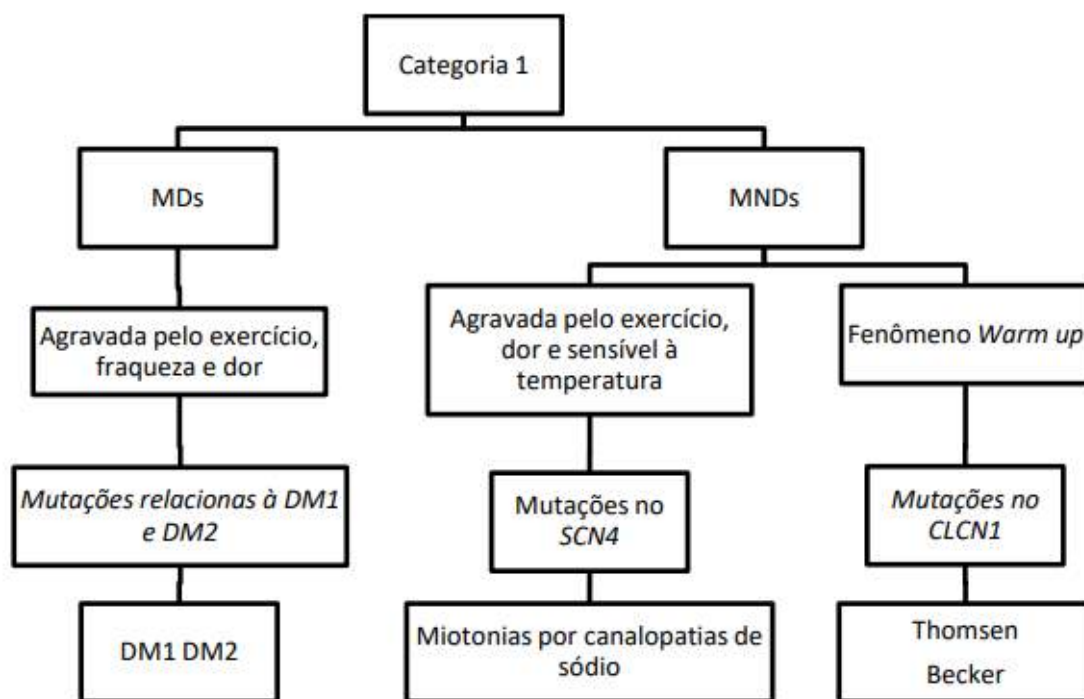


FIGURA 8: Fluxograma hierárquico, demonstrando um algoritmo que pode ser empregado para o diagnóstico das enfermidades miotônicas primárias, considerando características clínicas, EMG, histopatológicas e moleculares. Fonte: adaptado de Fontaine e Hanna (2010).

Portanto, pacientes acometidos por MNDs (exame histopatológico normal), sob padrão de herança dominante ou recessivo, pertencentes à categoria 1 e que possuem o fenômeno *warm-up*, devem ser principalmente investigados para mutações no gene *CLCN1* (FONTAINE E HANNA, 2010).

IV. MIOTONIA HEREDITÁRIA E CANAIS DE CLORO

IV.A) TERMINOLOGIA

Os defeitos moleculares nos canais iônicos de sódio e cloro são as principais causas das enfermidades miotônicas hereditárias, e são genericamente chamadas de miotonias congênicas (MATTHEWS et al., 2010). A principal causa de miotonia hereditária está relacionada a mutações no gene *CLCN1* responsável pela codificação dos canais de cloro (*CLC1*) da musculatura esquelética (Fontaine e Hanna, 2010).

A miotonia congênita é um termo médico que foi inicialmente usado para se referir às descrições clínicas de miotonia em cabras (BRYANT, 1969). Conforme as descrições dos defeitos moleculares foram surgindo, o termo miotonia congênita passou a ser majoritariamente utilizado como referência às enfermidades miotônicas decorrentes de defeitos no canal de cloro *CLC1* (FONTAINE; HANNA; PRESS, 2010; HAHN; SALAJEGHEH, 2016). Em medicina humana, essa nomenclatura é adotada pela Organização Mundial de Saúde- WHO e pelo banco de dados *Online Mendelian Inheritance in Man-NCBI* (OMIM, 2017; WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2016).

Quando a miotonia congênita ocorre sob modo de herança autossômico dominante, é também chamada de doença de Thomsen (MIM 160800); quando ocorre sob modo recessivo, é também chamada de doença de Becker (MIM 255700) (BECKER, 1977; OMIM, 2017; SUN et al., 2001; THOMSEN, 1876).

Em medicina veterinária, os termos miotonia congênita e miotonia hereditária são empregados para a enfermidade decorrente de defeitos no *CLC1* (BORGES et al., 2013; FINNIGAN et al., 2007; GANDOLFI et al., 2014; RHODES et al., 1999). Nesta tese, o termo miotonia hereditária será utilizado para referir a miotonia decorrentes de defeitos no *CLC1* decorrente de mutações no *CLCN1* acometendo suínos, e ainda, serão utilizados os termos autossômico dominante ou recessivo para descrever o padrão de herança.

IV.B) FISIOPATOLOGIA DA MIOTONIA CONGÊNITA

Em uma junção neuromuscular saudável, após uma despolarização, os canais de cloro, localizados principalmente no sistema tubular da membrana sarcolemal muscular, abrem-se permitindo o influxo de cloro na célula muscular, e dessa forma, repolarizando e retornando o potencial de membrana para o potencial de repouso (AROMATARIS; RYCHKOV, 2006; COOPER; JAN, 1999). A membrana celular do músculo esquelético possui alta condutância de íon cloro, principalmente em comparação com outros tipos celulares, essa característica é responsável por até 85% de toda a condutância iônica do sarcolema em repouso (BRETAG, 1987).

No músculo esquelético, a atividade do *CLC1* é essencial para assegurar a estabilidade elétrica, possibilitando que o sarcolema permaneça em um estado excitável. Quando este potencial de repouso não é adequado as fibras ficam hipopolarizadas e, dessa maneira, ocorre um estado de hiperexcitabilidade que pode contribuir para ocorrência da miotonia (HOFFMAN, 1995) .

A condutância do sarcolema para o Cl^- possui maior importância quando se considera o efeito despolarizante do acúmulo de potássio nos túbulos "T" durante a atividade muscular. Em pacientes com miotonia congênita, esse acúmulo de K^+ somado-se com o influxo insuficiente de Cl^- favorece a ocorrência de despolarizações da superfície da membrana que, pode resultar em um potencial de ação auto-sustentável, prolongando a contração (BROWN; JIMENEZ-MALLEBERA, 2010).

IV.C) DESCRIÇÕES DE MIOTONIA CONGÊNITA

A miotonia congênita foi descrita clinicamente em humanos pela primeira vez no final do século XIX pelo médico dinamarquês Asmus Julius Thomas Thomsen, ele e sua família eram acometidos pela miotonia, e a descreveu como uma alteração de rigidez muscular e a dificuldade de encerrar uma contração muscular (THOMSEN, 1876). Em animais a primeira descrição clínica de miotonia congênita deu-se em cabras,

descritas como *Fainting Goats* (WHITE; PLASKETT, 1904).

Somente 65 anos depois foi publicado um trabalho que descreveu cabras que apresentavam fibras musculares de reduzida condutância ao íon cloreto. Nesse momento, essa condição foi chamada de miotonia congênita (BRYANT, 1969). Esse estudo abriu portas para uma extensa linha de pesquisa, entretanto, as primeiras mutações patogênicas no *CLCN1* foram identificadas em ratos e humanos (DAVIES; HANNA, 2001; FONTAINE; HANNA; PRESS, 2010; HEATWOLE; STATLAND; LOGIGIAN, 2013; MANKODI et al., 2002; MATTHEWS et al., 2010; MILLER, 2008; NONAKA; SATOYOSHI, 1992).

Atualmente, mais de 200 mutações patogênicas no gene *CLCN1* foram identificadas nos seres humanos (HGDM, 2017), incluindo: deleções, inserções, mudanças na fase de leitura, códons de paradas prematuros (*nonsense*), polimorfismos com mudança do aminoácido codificado (*missense*) e mutações nas regiões de splicing (BRUGNONI et al., 1999; BURGUNDER et al., 2008; DE DIEGO et al., 1999a; ESTEBAN et al., 1998; FIALHO et al., 2007; HEINE et al., 1994; HOICHE et al., 2014a; LAKRAJ et al., 2013; MAZON et al., 2012; MOON et al., 2009; RAJA RAYAN et al., 2012a; RICHARDSON et al., 2014a; SANGIUOLO et al., 1998; SKÁLOVÁ et al., 2013; ULZI et al., 2012; WU et al., 2002) .

Em relação aos animais, existem descrições de miotonia congênita com defeito molecular esclarecidos em ratos (STEINMEYER; ORTLAND; JENTSCH, 1991), cabras (BECK; FAHLKE; GEORGE JR., 1996), cães (FINNIGAN et al., 2007; RHODES et al., 1999), cavalos (WIJNBERG et al., 2012a), búfalos (BORGES et al., 2013), gatos (GANDOLFI et al., 2014), peixe-zebra (CHENG et al., 2014) e ovelhas (MONTEAGUDO et al., 2015). Existem ainda, descrições da forma clínica de miotonia congênita acometendo bovinos (VAN NIEKERK; JAROS, 1970), contudo, defeitos moleculares nos canais de cloro bem como sua origem genética não foram ainda comprovados nessa espécie. Não existe relato na literatura científica acerca da miotonia congênita/hereditária acometendo suínos.

As mutações descritas no *CLCN1* causadoras de miotonia congênita em animais possuem efeitos variáveis nos aminoácidos do canal *CLC1*.

Na figura 9 estão representados os pontos de mutação causadores de MC, descritos em ovelhas, cães, peixe-zebra, cavalo e cabra, de acordo com a topologia do canal de cloro *CmCLC*. As mutações causadoras de MC em búfalos e em gatos afetam o processo de *splicing*, provando uma alteração que determina o menor número de aminoácidos na proteína *CLC-1*. No caso dos búfalos ocorre a tradução de uma proteína truncada e com apenas 154 aminoácidos, no caso dos gatos ocorre a ausência dos aminoácidos relativos aos éxons 15 e 16 (BORGES et al., 2013; GANDOLFI et al., 2014). As mutações relacionadas ao peixe-zebra são decorrentes de manipulação gênica para criação de animais transgênicos modelos experimentais para a miotonia congênita em humanos (CHENG et al., 2014).

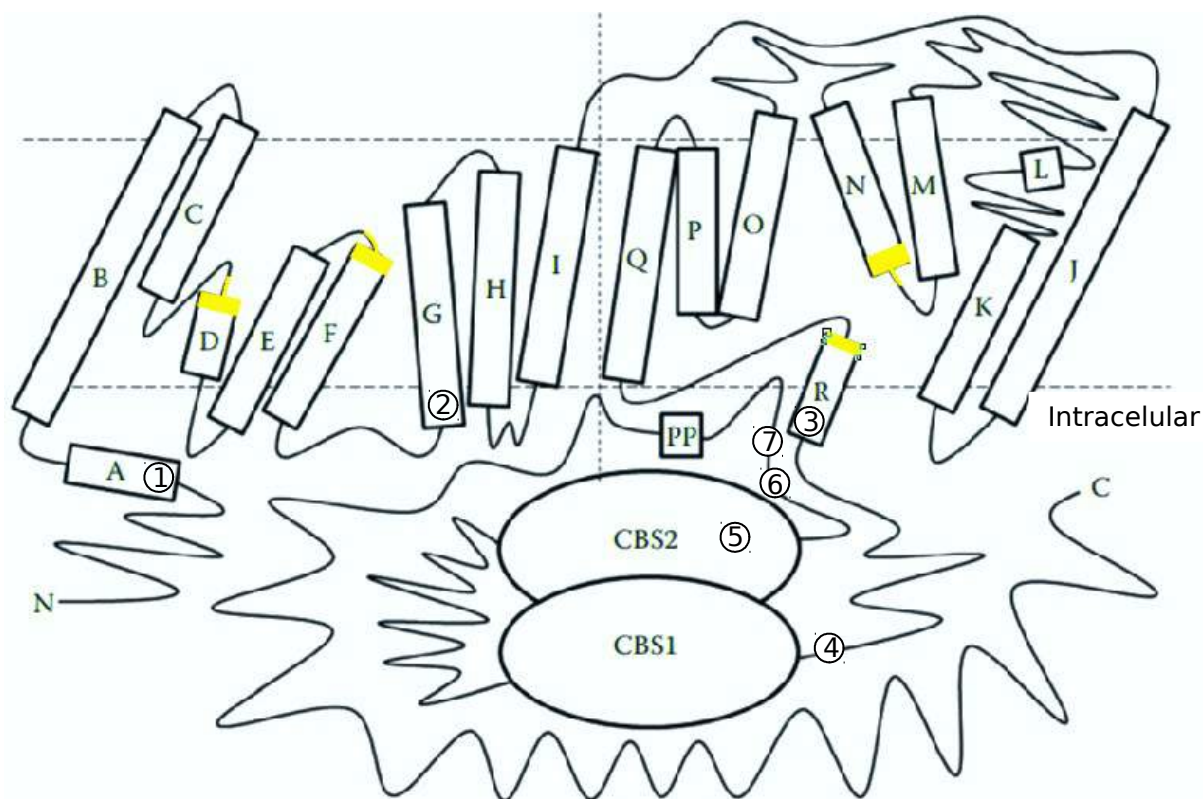


FIGURA 9: Representação esquemática bidimensional de um monômero/subunidade do cotransportador *CLC* de eucarioto- *CmCLC* (FENG ET AL. 2010). As linhas tracejadas horizontais representam a topologia da membrana plasmática. Os cilindros representam α Hélices, que necessariamente não atravessam a membrana plasmática embora estejam localizadas na membrana. As marcações amarelas representam as regiões que participam da formação do poro condutor seletivo para o íons cloreto. A longa cadeia C-Terminal está representada com seus dois

domínios CBS. A linha tracejada vertical representa as metades semelhantes da mesma subunidade. Os números 1, 2, 3, 4, 5, 6 e 7 são correspondentes aos pontos de mutações descritas em ovelhas, cão (Schnauzer), peixe-zebra, cavalo, peixe-zebra, cabra e cão (Australian cattle dog), respectivamente. Fonte: Adaptado de Bretag e Ma (2015).

IV.D) SINAIS CLÍNICOS DA MIOTONIA CONGÊNITA

O principal sinal clínico da miotonia congênita é a própria miotonia que é verificada como rigidez muscular após uma excitação. Geralmente estão presentes hipertrofia e fraqueza musculares especialmente nos músculos epaxiais e apendiculares proximais (JURKAT-ROTT; LEHMANN-HORN, 2005b).

A rigidez muscular ocorre depois da excitação do tecido muscular, as membranas das fibras musculares individuais podem continuar a gerar séries de potenciais de ação por alguns instantes. Esta atividade evita que relaxamento muscular adequado ocorra (LEHMANN-HORN; JURKAT-ROTT, 1999). De modo geral as pessoas acometidas por miotonia congênita relatam rigidez muscular após iniciar o movimento, que melhora conforme se mantem a atividade muscular, caracterizando o fenômeno *warm-up* (LOSSIN; GEORGE JR., 2008). O atraso no relaxamento do músculo esquelético não é acompanhado por dor (BARCHI, 1994).

Considerando as descrições clínicas dos animais acometidos por miotonia congênita, os sinais clínicos são semelhantes aos que ocorrem na espécie humana. A primeira descrição acometendo animais foi relacionada a espécie caprina, os animais foram descritos apresentando desmaios e membros pélvicos rígidos (WHITE; PLASKETT, 1904). Esses sinais clínicos foram corroborados por outros estudos realizados em cabras, ovinos e búfalos. Animais dessas espécies afetados por miotonia congênita apresentavam sinais comuns de hipertrofia e rigidez muscular com intensidade variável entre os animais, nos mais gravemente acometidos ocorre impossibilidade transitória da locomoção, quedas e permanência em decúbito por alguns instantes sob um episódio de crise.

O episódio de rigidez muscular intensa seguida de decúbito pode ser desencadeado quando o animal é submetido a estímulo visual/auditivo ou após uma tentativa de fazer movimentos bruscos espontâneos principalmente após um período de repouso (BORGES et al., 2013; BRYANT, 1969; GANDOLFI et al., 2014; MONTEAGUDO et al., 2015; VITE et al., 1998, 1999).

Além dos sintomas descritos acima, os cães afetados também apresentam mobilidade da língua diminuída, “pulo de coelho” quando estimulados a correr, e paralisia das pregas vocais verificada no exame de laringe sob leve sedação (FINNIGAN et al., 2007; VITE et al., 1998, 1999). Além desses sinais clínicos, gatos acometidos demonstraram hipertrofia da língua e mobilidade da mandíbula diminuída (GANDOLFI et al., 2014). Geralmente os animais não apresentam aumento das concentrações séricas de creatinina kinase (CK) (GANDOLFI et al., 2014; GASCHEN; JAGGY; JONES, 2004; HICKFORD et al., 1998; TOLL; COOPER; ALTSCHUL, 1998; VITE et al., 1998) .

De forma geral, as descrições clínicas da miotonia congênita apresentam certa heterogeneidade. Sob padrão recessivo as mutações no gene *CLCN1* causam perda de função nas duas subunidades do canal de cloro. Sob padrão dominante a subunidade afetada pela mutação possui um efeito negativo dominante sobre a subunidade normal (DUFFIELD et al., 2003; KOCH et al., 1992a; PORTARO et al., 2015). As alterações funcionais no *CLC1* decorrentes das mutações no *CLCN1* são variáveis, pois estão relacionadas com a implicância fisiológica de cada mutação considerada. Além disso, a estrutura peculiar do *CLC1* de possuir duas subunidades que podem funcionar independentes entre si também contribui para heterogeneidade dos diversos fenótipos resultantes de mutações no gene *CLCN1* (PORTARO et al., 2015).

V) JUSTIFICATIVA

Os primeiros suínos afetados pela miotonia hereditária foram encontrados no estado do Pará. Nessa situação, os docentes da Universidade Federal do Pará - *Campus* Castanhal verificaram que os animais apresentavam sinais clínicos semelhantes à miotonia hereditária. Uma família de animais afetados pela miotonia passou a ser mantida nas dependências da Universidade Federal do Pará-UFGPA, *campus* Castanhal - PA. Foram realizadas visitas à UFGPA, para realização de exame clínico, exame de EMG, coleta de informações e material biológico.

Além da importância da espécie suína para a produção de carne, a importância desse estudo deve-se principalmente devido à semelhança clínica das descrições de miotonia congênita somada à alta homologia do gene *CLCN1* e da proteína *CLC1* verificadas entre as espécies animais. Esses aspectos ressaltam a importância de estudos descritivos dessa enfermidade, independente da espécie animal. A hipótese do presente estudo foi que esses animais com sinais clínicos de miotonia são acometidos por miotomia hereditária e portadores de alteração(ões) no gene *CLCN1*.

Não existe relato prévio na literatura científica mundial relacionado ao sinal clínico de miotonia nessa espécie animal. Portanto, é provável que se trate de uma condição rara nessa espécie. A descrição de suínos com miotonia hereditária é um modelo interessante para a avaliação de variabilidade fenotípica entre diferentes espécies animais, inclusive a humana.

OBJETIVOS

VI. OBJETIVOS

VI.A) OBJETIVO GERAL

Descrever, sob aspectos clínicos e moleculares, uma nova enfermidade neuromuscular em suínos.

VI.B) OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar a caracterização clínica e eletromiográfica da miotonia hereditária em uma família de suínos.
- Determinar o padrão de herança.
- Descrever os achados morfológicos de biópsias musculares dos animais afetados.
- Determinar a sequência de nucleotídeos codificante para proteína *CLC1* de suínos normais e dos afetados.
- Descrever a alteração genética causadora de miotonia hereditária em suínos.
- Padronizar um teste molecular diagnóstico para a miotonia hereditária em suínos.

MATERIAL E MÉTODOS

VII. MATERIAL E MÉTODOS

VII.A) ANIMAIS UTILIZADOS

Para realização desse estudo, foram utilizados 22 animais pertencentes à 3 gerações F0 (n=5), F1 (n=6), F2 (n=11) de uma família de suínos sem raça definida, localizados na UFPA *campus* Castanhal-PA. Nove animais pertencentes a essa família possuíam miotonia, desses, cinco animais da geração F0 e quatro animais da geração F2.

Foram utilizados dois animais da raça *Large White* pertencentes à UFPA *campus* Castanhal-PA, dois animais SRD pertencentes a uma propriedade privada localizada em Botucatu-SP 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. Esses seis animais não tinham parentesco com os animais afetados e foram utilizados como controle nas análises moleculares.

Para validação do teste de genotipagem, foram utilizados, além dos 28 animais experimentais, 150 amostras de sangue de suínos amostrados por conveniência, não relacionados aos 26 animais experimentais e pertencentes a granjas localizadas nos estados de Santa Catarina, Paraná, São Paulo e Goiás. A amostragem desses animais deu-se por conveniência, admitindo-se animais adultos de todas categorias. Todos animais utilizados foram identificados e estão discriminados na tabela 4.

TABELA 4: Relação dos 28 animais utilizados na pesquisa.

Animal	Categoria	Fenótipo
A	Fêmea adulta (F0)	Miotônico
B	Macho adulto (F0)	Miotônico
C	Macho adulto (F0)	Miotônico
D	Macho adulto (F0)	Miotônico
E	Macho adulto (F0)	Miotônico
F	Fêmea adulta (F1)	Normal
G	Fêmea adulta (F1)	Normal
H	Fêmea adulta (F1)	Normal
I	Fêmea adulta (F1)	Normal
J	Macho adulto (F1)	Normal
K	Macho adulto (F1)	Normal
L	Fêmea Jovem (F2)	Normal
M	Fêmea Jovem (F2)	Normal
N	Fêmea Jovem (F2)	Normal
O	Fêmea Jovem (F2)	Miotônico
P	Fêmea Jovem (F2)	Miotônico
Q	Macho jovem (F2)	Normal
R	Macho jovem (F2)	Normal
S	Macho jovem (F2)	Normal
T	Macho jovem (F2)	Normal
U	Macho jovem (F2)	Miotônico
V	Macho jovem (F2)	Miotônico
1	Macho Adulto (C)	Normal
2	Fêmea Adulta (C)	Normal
3	Macho Adulto (C)	Normal
4	Fêmea Adulta (C)	Normal
5	Macho Adulto (C)	Normal
6	Fêmea Adulta (C)	Normal
150	150 animais para teste genético	Normal

A - V 22 animais membros da família de miotônicos. 1-6 animais controles não relacionados aos animais miotônicos. F0 - primeiros animais a apresentar sinais clínicos de miotonia. F1 - filhos de animais F0. F2 - filhos de animais F1.

VII.B) COLETA DE AMOSTRAS BIOLÓGICAS

Foram colhidas amostras de sangue total por venopunção das veias auriculares, utilizando um sistema de colheita a vácuo (Vacutainer®) com agulhas 21G e tubos de colheita de sangue com anticoagulante EDTA (BD Vacutainer®). As amostras de sangue foram mantidas refrigeradas até

realização da extração do DNA genômico.

Foram realizadas biópsias musculares dos 22 membros da família de animais miotônicos (animais A - V) e de 4 animais do grupo controle (1-4). Foram colhidas amostras de aproximadamente 9mm² dos músculos glúteo médio e/ou *longuíssimus dorsi*, totalizando até 4 amostras por animal. Para isso os animais foram apropriadamente anestesiados. Como medicação pré-anestésica foi empregado acepromazina (0,1mg/kg) associada a midazolam (0,5mg), ambos fármacos na mesma seringa. Após a prostração foram realizadas tricotomia, assepsia e anestesia local com infiltração de 10ml de lidocaína 2% na derme e tecido subcutâneo. Os animais foram anestesiados com quetamina (5mg/kg) (MASSONE, 2011), após 5 minutos, a incisão cirúrgica de pele de aproximadamente 2,5 cm foi realizada para coleta de tecido muscular utilizando *punch* cutâneo de 5mm. Posteriormente, foi realizada a síntese utilizando fio não absorvível nylon-0 sob padrão “simples separado”, curativo local com antissépticos, bem como acompanhamento do processo de cicatrização.

Cada amostra de tecido muscular foi dividida. Parte foi acondicionada em criotubo estéril e congelados à -20°C, para posteriormente, extração de DNA. Outro fragmento mantido com RNAlater® para posterior extração de RNA para a produção de cDNA e outro fragmento mantido em solução de formol 10% para confecção de lâminas histológicas.

VII.C) EXAME CLÍNICO DOS ANIMAIS

Foi realizado exame clínico de todos os 28 animais com ênfase em sistema muscular (RADOSTITS et al., 2002), sendo utilizados somente animais saudáveis, com exceção daqueles que apresentavam os sinais clínicos de miotonia. Todos os exames foram realizados na UFPA *campus* Castanhal-PA ou na FMVZ-UNESP-Botucatu.

Foi consultado o histórico dos 22 animais pertencentes à família de miotônicos. Informações do parentesco foram obtidas para possibilitar a construção do heredograma e caracterização da enfermidade miotônica quanto ao padrão de herança.

VII.D) BIOQUÍMICA SÉRICA

Amostras de quatro animais (A-D) que apresentavam miotonia foram colhidas em dois momentos distintos, com três meses de intervalo. Foram mensurados os valores séricos de aspartato aminotransferase (AST), alanina transaminase (ALT), fosfatase alcalina (FA), gamaglutamiltransferase (GGT), creatina kinase (CK), desidrogenase láctica (DHL), bilirrubina total (BT), bilirrubina direta (BD), bilirrubina indireta (BI), uréia e creatinina. Os valores obtidos, foram avaliados comparada aos valores de referência para a espécie (KANECO; HARVEY; BRUSS, 2008)

VII.E) HISTOPATOLOGIA

As amostras de tecido muscular de 5 animais (A-E) foram acondicionadas em solução de formol à 10% e incluídas em parafina para obtenção de cortes histológicos de 6 a 8 μm . As lâminas foram processadas para coloração de hematoxilina e eosina (H&E) e ácido periódico-Schiff (PAS). As lâminas foram avaliadas subjetivamente quanto morfologia e coloração das fibras musculares e quanto à presença de alterações como degeneração, fagocitose ou necrose.

VII.F) ELETROMIOGRAFIA

O exame de EMG foi realizado com os animais em repouso, em posição quadrupedal e/ou decúbito lateral. Foram examinados 4 animais afetados (A-D) e 2 animais normais (1-2). Para isso, foram utilizados eletrodos de agulhas concêntricas e o equipamento Neuromax 1000® de 2 canais. O filtro passa-banda (*band pass*) foi ajustado em 10 a 10.000 Hz.

Foram avaliadas os músculos epaxiais e os proximais dos quatro

membros, os músculos glúteo médio, músculo supra espinhoso, músculo infra espinhoso, tríceps braquial e longuíssimos dorsi. O traçado eletromiográfico foi comparado de forma qualitativa para o diagnóstico de miotonia, entre o grupo dos animais afetados e normais.

VII) ANÁLISE MOLECULAR

VII.G) ANÁLISE *IN SILICO* DAS SEQUÊNCIAS DOS TRANSCRITOS X1 E X2 DE RNA DO *CLCN1* SUÍNO

Para desenho dos oligonucleotídeos iniciadores, as sequências referência dos transcritos para o *CLCN1* suíno foram utilizadas. Essas sequências X1 (XM_021078561.1) e X2 (XM_021078562.1) (disponíveis no banco de dados *Reference sequence* RefSeq - NCBI) foram avaliadas quanto à identidade entre diferentes espécies de mamíferos. Para isso utilizou-se a ferramenta on line BLAST (Basic Local Alignment Search Tool, <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

Também foi realizado o alinhamento entre as sequências dos transcritos X1 e X2, para demonstrar as diferenças existentes, utilizando o programa Geneious® versão 10.2.3 (Biomatters, Auckland-New Zealand) (KEARSE et al., 2012).

VII.H) REAÇÕES DE EXTRAÇÃO DE RNA, SÍNTESE DE CDNA E RT-PCR.

A partir das amostras de tecido muscular, o RNA total foi extraído utilizando o kit RNeasy® Mini Kit (Qiagen™), seguindo as recomendações do fabricante. A pureza relativa e a concentração foram determinadas por espectrofotometria utilizando o NanoDrop® 2000 spectrophotometer (ThermoScientific™). Posteriormente, para eliminação de DNA genômico, o RNA total foi tratado com RQ1 RNase-Free DNase® (Promega™, USA). O RNA tratado (RNAtto) foi submetido a nova análise por espectrofotometria e utilizado para preparação do cDNA. A síntese de cDNA foi preparada para um volume final de 60µl,

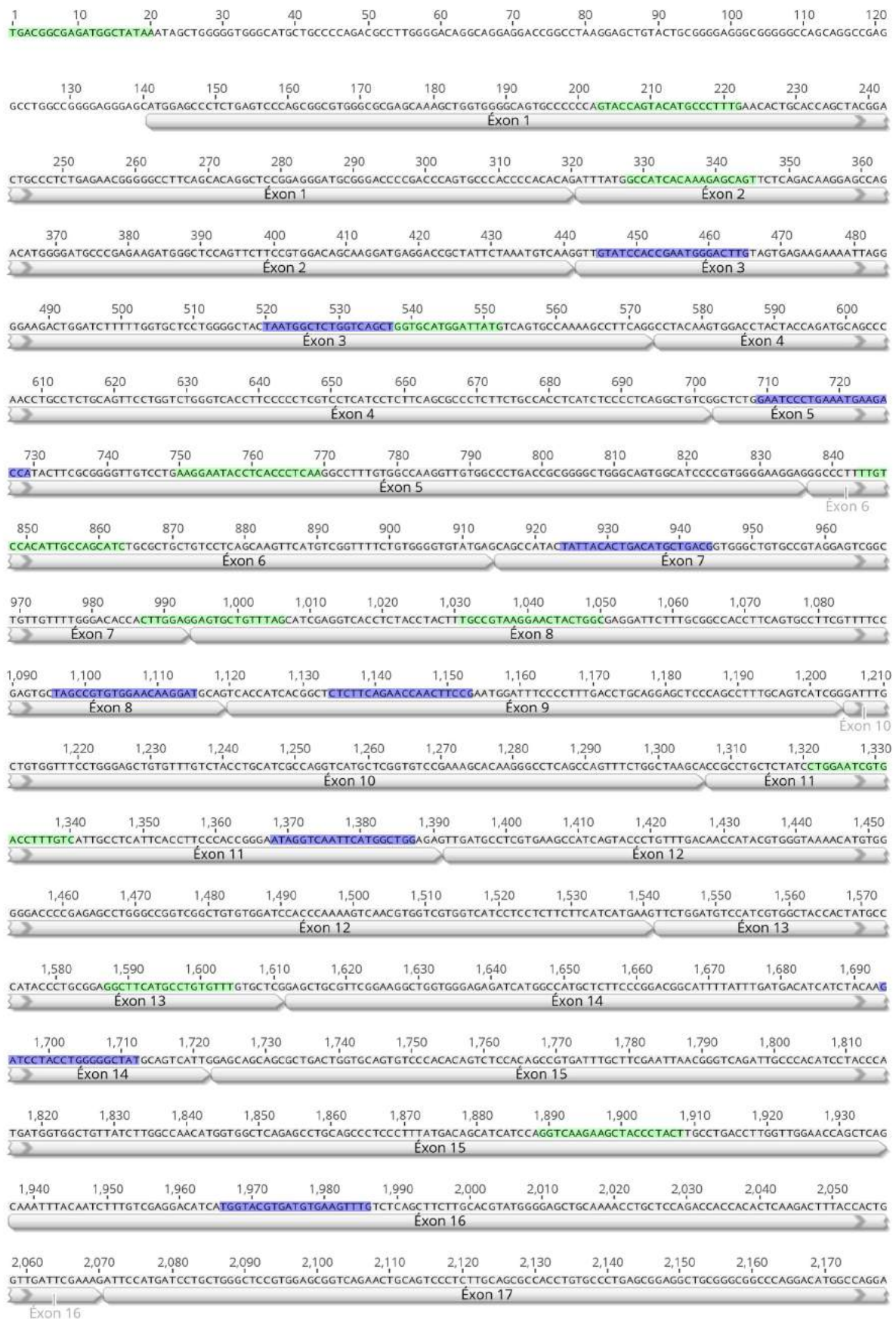
utilizando 800 ng de RNAtto, random primers e a enzima ImProm-II® Reverse Transcription System (Promega, USA™) seguindo as recomendações do fabricante.

Com objetivo de amplificar e realizar sequenciamento direto pelo método Sanger toda a sequência codificante do RNAm do *CLCN1* suíno, foram desenhados oligonucleotídeos iniciadores ao longo da sequência referência X1 (XM_021078561.1) (Figura 10). Ao todo 14 *amplicons* foram utilizados para a cobertura total do RNAm (Tabela 5).

As reações de RT-PCR foram preparadas para um volume final de 25µl, contendo: 2 µl de cDNA (aproximadamente 26 ng), 240 nM de *cada* oligonucleotídeo iniciador (utilizados aos respectivos pares), 12,5 µl do mix GoTaq® Green Master Mix (Promega, USA™) e água nuclease free q.s.p. As condições de termociclagem foram adaptadas para cada amplicon. Foram utilizadas amostras de cDNA dos suínos afetados A, B, C, D e E.

TABELA 5 - Relação de primers desenhados ao longo da sequência referência X1 (XM_021078561.1).do RNAm do gene *CLCN1* suíno.

PRIMER ID	TIPO	SEQUÊNCIA 5'>3'	LOCALIZAÇÃO
F1	<i>Forward</i>	TGACGGCGAGATGGCTATAA	UTR 5'
F2	<i>Forward</i>	GTACCAGTACATGCCCTTTG	Éxon 1
F3	<i>Forward</i>	GCCATCACAAAGAGCAGT	Éxon 2
F4	<i>Forward</i>	AGCTGGTGCATGGATTATG	Éxon 3
F5	<i>Forward</i>	AAGGAATACCTCACCTCAA	Éxon 5
F6	<i>Forward</i>	TTGTCCACATTGCCAGCATC	Éxon 6
F7	<i>Forward</i>	CTTGGAGGAGTGCTGTTTATG	Junção éxons 7-8
F8	<i>Forward</i>	TGCCGTAAGGAAGTACTGGC	Éxon 8
F9	<i>Forward</i>	CTGGAATCGTGACCTTTGTC	Éxon 11
F10	<i>Forward</i>	GGCTTCATGCCTGTGTTT	Éxon 13
F11	<i>Forward</i>	GGTCAAGAAGCTACCCTACT	Éxon 15
F12	<i>Forward</i>	TTCGCCTTTGTGGATGAG	Éxon 17
F13	<i>Forward</i>	GCTCGTCCCACAAAGAAA	Éxon 19
F14	<i>Forward</i>	GCCTCCACCTTGCTTATGT	Éxon 22
R1	<i>Reverse</i>	CAAGTCCCATTTCGGTGGATAC	Éxon 3
R2	<i>Reverse</i>	AGCTGACCAGAGCCATTA	Éxon 3
R3	<i>Reverse</i>	TGGTCTTCATTTTCAGGGATTC	Éxon 5
R4	<i>Reverse</i>	CGTCAGCATGTCAGTGTAAATA	Éxon 7
R5	<i>Reverse</i>	ATCCTTGTTCCACACGGGCTA	Éxon 8
R6	<i>Reverse</i>	CGGAAGTTGGTTCTGAAGAG	Éxon 9
R7	<i>Reverse</i>	CCAGCCATGAATTGACCTAT	Éxon 11
R8	<i>Reverse</i>	ATAGCCCCCAGGTAGGATC	Éxon 14
R9	<i>Reverse</i>	CAAACCTTCACATCACGTACCA	Éxon 16
R10	<i>Reverse</i>	CAGACATCCTCATCCTCGT	Éxon 17
R11	<i>Reverse</i>	GAACAGGGTGTGAGTCTTG	Junção éxon 21-22
R12	<i>Reverse</i>	CCATCATCAGGCATGGTC	Éxon 23
R13	<i>Reverse</i>	ATCAGTTCGTCCTCATCCT	Éxon 23
R14	<i>Reverse</i>	CCCACCTTTAGGAAATACCCTCTC	UTR 3'



2,180 2,190 2,200 2,210 2,220 2,230 2,240 2,250 2,260 2,270 2,280 2,290
 AGTTGTCTGAGCTGCCCTTCGATGGCAAGGCTGGGGTGGGGGCCCGTGGCTGTGGCCGCAAGGGGGCCCTGAGTCTTCGCCTTTGGATGAGGACGAGGATGAGGATGCTCCGGGAA
 Exon 17

2,300 2,310 2,320 2,330 2,340 2,350 2,360 2,370 2,380 2,390 2,400 2,410 2,420
 GCCCGAGCCCTCCTTTGACTCCTCCTCTTCCCTTTCCACTGCTCCACGACCCCTGAAGAGCCCAATGGGCCCTGCCAGCCCAAGCAGCAGCCGGAAAGCACCAGAGCTGCAGGT
 Exon 17 Exon 18 Exon 19

2,430 2,440 2,450 2,460 2,470 2,480 2,490 2,500 2,510 2,520 2,530 2,540
 CAAAGACCCTCTGTCTTTCGGACCCCTGCTGCGTCTGTGCTGGGAGAGCTCGTCCACAAAGAAAAAACCACCCAGGAGCCAGTGGATTTAGTGGATAACATGTCCCTGAAGACATTG
 Exon 19 Exon 20 Exon 21

2,550 2,560 2,570 2,580 2,590 2,600 2,610 2,620 2,630 2,640 2,650 2,660
 AAGCCCTGGAGCGGAGCAGCTGAGCCAACCTGTGTGTTTGGACTGCTGTGTGATCGACCAAGTCCCTCCAGCTGGTGGAGCAGAGCTCTGCACAAGACTCACACCTGTTCGCT
 Exon 21 Exon 22

2,670 2,680 2,690 2,700 2,710 2,720 2,730 2,740 2,750 2,760 2,770 2,780
 CTTGGCTCCACCTTGGTTATGTCACGATGGGAAAGCTCAGGGGTGCTGGCTTGGAGGAGCTCCAGAAAGCCATCGAGGGGCACACAAGTCCGGGTGCAACTCCGCCACCC
 Exon 22 Exon 23

2,790 2,800 2,810 2,820 2,830 2,840 2,850 2,860 2,870 2,880 2,890 2,900
 CTTGCCAGCTTCCGGAGTACCCTTCACTCGAAAGACTCTGGGGGCCGCTCCCTCCTGCAGAGGCTTGGACCATGCCATGATGGAACGGGGCCACTAGTGCAGGGGATGCAGCTC
 Exon 23

2,910 2,920 2,930 2,940 2,950 2,960 2,970 2,980 2,990 3,000 3,010 3,020
 CTGACTCCCAAGAGACCCTGTGCCATCCCATCCAGAGCCCTCTCTCCCGGGCTCCGGCCAAAGGCAGAGAGCGAGCTGGAGGAGCTGGAGCTGGCGGAGAGTCCGGGCCGGAAGA
 Exon 23

3,030 3,040 3,050 3,060 3,070 3,080 3,090 3,100 3,110 3,120 3,130 3,140
 GGAGCTGGCTGACATCTTGCAGGGCCCAAGTCTGCTCTCAACGACGAGGAGGATGAGGACGAAGTACTCTTTGATCATCGCTGGCCCTCTCATCGATGGTCCAGAGACCAGGCTAG
 Exon 23

3,150 3,160 3,170 3,180 3,190 3,200 3,210 3,220 3,230 3,240 3,250 3,260
 AAGGTGGCCCTGTGGGGGAGAGGGTATTTCCATAAGTGGGAGAGATCGCACCCCAATAGCCAGCCCTCCAGGAATTAAGAAACGTGATAGTATAACATTGGAGCAGGAGCCAGAGT
 Exon 23

3,270 3,280 3,290 3,300 3,310 3,320 3,330 3,340 3,350 3,360 3,370 3,380
 TTAGGCAGGGAGTAGCCTCGGTCAATTATTTGGGCATGTCCCCACCCCAAGACAGGTGGTGTCTACGCGCTGGGAAGGGCCCTTGATATCCAGGGGCTTCTGAGTCTGCTGTG

3,390 3,400 3,410 3,420 3,430 3,440 3,450 3,460 3,470 3,480 3,490 3,500
 CGTGGGTGGGAGCACCTGCCTCTCTGCTCCCTAGTCAAGCCCTCACTCTCCCTGCTTCTTGCCAGTACCTCTGGCTTGGCCATCAGTCTCTCAGAGGGTAGGTGAAGGGA

3,510 3,520 3,530 3,540 3,550 3,560 3,570 3,580 3,590 3,600 3,610 3,620 3,630
 GGCCCAAGGATGACTGGGGCCCGCCAGGGCCATGTTGGAGGAAGAGATGGGACCACTCTGGCTCAGGGACTGACGGCCCAAGGGTATACTCACAAGCGCCACAGTCCCTCTCTCG

3,640 3,650 3,660 3,670 3,680 3,690 3,700 3,710 3,720 3,730 3,740 3,750
 GGGCCCCACCCGCTCCACTCGCCCAAGCAGCACTCCGAACTGCTCCGACACCACTCTGGCTCCACTGCTGTCCGACAGACAAGGCCATTACTAGCAAGGCCGGAGGCCAGT

3,760 3,770 3,780 3,790 3,800 3,810 3,820 3,830 3,840 3,850 3,860 3,870
 CCATTTCTTCTGCTGGTCTCCAGTCAAGCAGGGAAGTTGGGTAAGAGACCACTGGGAGAAAGAGCTGGGAGTGGAGTGGGCATTTGTGGCAGGCAAGCCCTCCGGCTCCAGTGA

3,880 3,890 3,900 3,910 3,920 3,930 3,940 3,950 3,960 3,970 3,980 3,990
 TTCACCTAACCTTGGCAGAAGTTCCTCCATCTCACATCACCCTCTTGGCTCCAGTTTCCAGGTCACCTCCCTCTCTACTGCACTGTGCTGACCAAGGGTCAAGCTTTGACCTTG

4,000 4,010 4,020 4,030 4,040 4,050 4,060 4,070 4,080 4,090 4,100 4,110
 AGCTGTTCTAGCTGGGGCTTCTCCAGCCGGGAACCAAGGACCCAGGGCAGCTGGGGCACTAGTTCACCCAGGAACACACAAGCCCTTCGTAGGGACTTTGTGTTCTCTCTGGGGTCACT

4,120 4,130 4,140 4,150 4,160 4,170 4,180 4,190 4,200 4,210 4,220 4,230
 GCCAAGACGGGAGACCCATTCAATCTTCCACACCAGGGGAGTCAGATCTTATCTTCCCAAGCCAGTGACAGGGGGTCTGCTATTGCCCTGCTTTCCAGGAGCCATTTCTGAGCAGC

4,240 4,250 4,260 4,270 4,280 4,290 4,300 4,310 4,320 4,330 4,340 4,350
 CAGGACCCCTGCTCCACACCCAAAGGCTTTTGTCTCCCTCCCTCTGTCCTGCTGTTTCGTTCTGACGGGGTCTTCTTCCAGGACGCTCATCTCCCAACCTGTGCCAGT

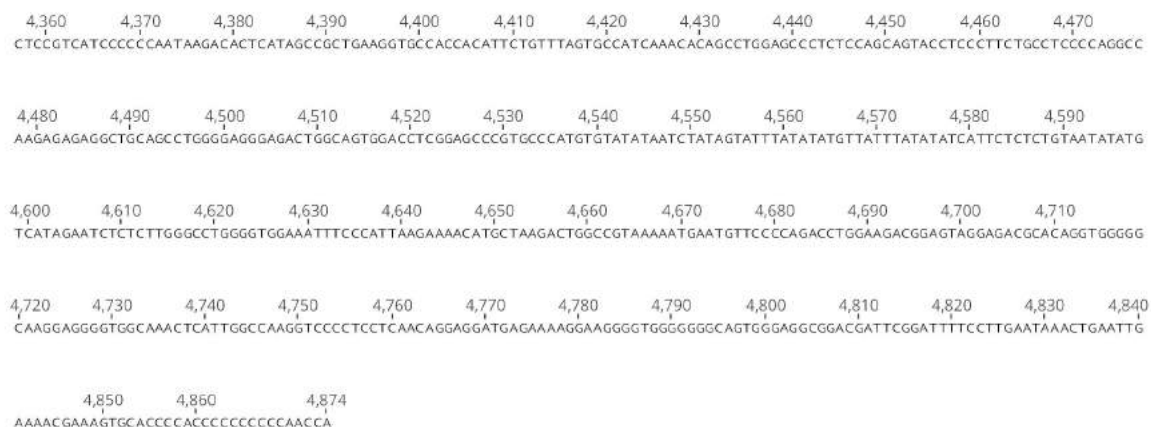


FIGURA 10: Localização dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados para amplificação de toda a sequência de nucleotídeos do transcrito X1-*CLCN1* suínos. Os éxons estão representados pelas setas cinzas. Os oligonucleotídeos senso estão ressaltados em azul. Os oligonucleotídeos anti-senso estão ressaltados em verde.

VII.I) REAÇÕES DE EXTRAÇÃO DE DNA E PCR

O DNA foi extraído das amostras de músculo dos animais afetados utilizando o kit DNeasy® Blood & Tissue (Qiagen™), de acordo com o protocolo recomendado pelo fabricante. Utilizando as amostras de sangue total, o DNA foi extraído utilizando o kit ReliaPrep™ Blood gDNA Miniprep System® (Promega™), de acordo com o protocolo recomendado pelo fabricante. O DNA extraído foi testado para pureza (A260/280) e concentração no NanoDrop® 2000 spectrophotometer (ThermoScientific™) sendo imediatamente armazenada em freezer a -80°C.

Com o objetivo de amplificar e sequenciar pelo método Sanger a região entre os íntrons 14 e 16 dos animais *Wild types* e afetados, foram utilizados oligonucleotídeos iniciadores (Tabela 6). Foi utilizada como referência a sequência do gene *CLCN1* suíno NC_010460.4. Reações de PCR convencional foram realizadas conforme descrito, e foram utilizadas

amostras de DNA dos animais afetados A, B, C, D e E, e dos animais controles 1 e 2.

TABELA 6: Relação de oligonucleotídeos desenhados com o objetivo de amplificar o segmento entre os íntrons 14 e 16 do gene CLCN1 suíno.

PRIMER ID	TIPO	SEQUENCIA 5'>3'	LOCALIZAÇÃO
FDNA1	<i>Forward</i>	ACATCTTTGAGCCCTTGTTTCT	Intron 14
FDNA2	<i>Forward</i>	GTTAGCTGCCTTTCTGCACC	Intron 14
FDNA3	<i>Forward</i>	TATGGCTTCCCCTGCATCTTT	Intron 14
FDNA4	<i>Forward</i>	TATCGTTGACTTACTTACCATGC	Intron 14
FDNA5	<i>Forward</i>	CCCCACCCTATCATTCC	Intron 14
FDNA6	<i>Forward</i>	CATCCTGTTCCCATGTAGCCT	Intron 14
FDNA7	<i>Forward</i>	ACTCACCATGACCAACAGCA	Intron 16
FDNA8	<i>Forward</i>	AGCAGAATCCCAGTAAATAGAT	Intron 16
RDNA1	<i>Reverse</i>	CTCAGCGGTCACAAACCTG	Intron 14
RDNA2	<i>Reverse</i>	ACGGTTAATGCCCTAAGGAC	Intron 14
RDNA3	<i>Reverse</i>	AGTGGGTCAGTTACACATAC	Intron 14
RDNA4	<i>Reverse</i>	GAATGGACTGCAGACAGCGA	Intron 16
RDNA5	<i>Reverse</i>	CATTAACATTGAACTCAC	Intron 16
RDNA6	<i>Reverse</i>	TACTCGAGGGCAATTTTAAACA	Intron 16
RDNA7	<i>Reverse</i>	TCGGATTCATTTCTGCGGCGC	Intron 16
RDNA8	<i>Reverse</i>	TCCATCCCCCAAAGGACCC	Intron 16
RDNA9	<i>Reverse</i>	TTTCTTTTTGGGGGACAGGCT	Intron 16

VII.J) ELETROFORESE

Todos os produtos amplificados foram analisados por eletroforese (Major Science TM, Saratoga, CA, USA) em gel agarose 1,5% corado (GelRed TM Biotium, Halward, CA, USA) e comparados com marcador de peso molecular (LowRanger 100 pb DNA ladder®, HighRanger 1 Kb DNA ladder®, NorgenTM, BioTek Corporation, Ontario, Canada), sendo posteriormente fotografados em transiluminador UV (ImageQuant® imager, GE Healthcare). As condições de amperagem, voltagem e tempo foram ajustadas para cada reação.

VII.K) SEQUENCIAMENTO SANGER

Após confirmação do tamanho específico, cada produto foi purificado utilizando o GenEluteTM PCR Clean-Up Kit (Sigma-Aldrich®), seguindo as recomendações do fabricante. Os produtos de PCR

convencional foram sequenciados pelo método Sanger, utilizando o equipamento 3.500 Genetic Analyzers (Applied Biosystems®). As reações de sequenciamento foram preparadas para um volume final de 10µl, contendo 1.0 ul do oligonucleotídeo *Forward* ou *Reverse* utilizados na reação de PCR sob concentração de 5 uM, 2µL do produto de PCR purificado, 1.0 ul do mix BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems®) , 1.5 uL da solução tampão BigDye® Terminator v1.1 & v3.1 5X Sequencing Buffer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) e água nuclease *free q.s.p.* Após o sequenciamento, o controle da qualidade das sequências obtidas e os eletroferogramas foram gerados utilizando o software Sequencing Analysis 5.3.1 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

As sequências obtidas foram validadas para *CLCN1* suíno, utilizando a ferramenta *online* BLAST (Basic Local Alignment Search Tool, <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) e o alinhamento das sequências foi realizado utilizando o programa Geneious® versão 10.2.3 (Biomatters, Auckland-New Zealand) (KEARSE et al., 2012) considerando a sequência genômica onde está anotado o gene *CLCN1* suíno NC_010460.3. para as amostras de PCR utilizando DNA e, XM_021078561.1 para as amostras de PCR utilizando cDNA.

VII.L) DESENVOLVIMENTO DO TESTE DIAGNÓSTICO

Para possibilitar a genotipagem de suínos para o defeito no gene *CLCN1*, causadora de MC, foram utilizados oligonucleotídeos que flanqueassem a região da deleção (Tabela 7).

Foram padronizadas reações de PCR para um volume final de 25µl utilizando, 2 µl de DNA (aproximadamente 0,4 µg), 240 nM do oligonucleotídeo *forward*, 120 nM de cada oligonucleotídeo *reverse*, 12,5 µl do mix GoTaq® Green Master Mix (Promega, USA™) e água nuclease *free q.s.p.* As condições de termociclagem foram, desnaturação inicial de 95°C por 2 min., 35 ciclos de desnaturação 95°C por 30seg., anelamento a 60°C por 30 seg., extensão a 72°C por 1 min., seguido por extensão final a 72°C por 5 min.

TABELA 7: Relação dos primers utilizados no desenvolvimento do teste molecular para diagnóstico e genotipagem de miotonia hereditária em suínos.

PRIMER ID	TIPO	SEQUENCIA 5'>3'	LOCALIZAÇÃO
Ftest1	<i>Forward</i>	TATGGCTTCCCCTGCATCTTT	Intron 14
Rtest1	<i>Reverse</i>	GTATGTGTAAGTACCCACT	Intron 14
Rtest2	<i>Reverse</i>	GGGTCCTTTGGGGGATGGA	Intron 16

A análise *in silico* comparando a localização dos oligonucleotídeos com as sequências obtidas, possibilitou calcular o tamanho dos *amplicons* decorrentes da combinação dos primers e do tipo de amostra de DNA: *wild type*, heterozigoto ou homozigoto (Tabela 8) (Figura 11). Dessa forma a genotipagem foi realizada utilizando eletroforese dos *amplicons*.

TABELA 8: Produtos resultantes do teste de genotipagem em relação a deleção causadora de miotonia hereditária em suínos.

GENOTIPO	TAMANHO DO PRODUTO DE PCR
	RESULTANTE (pb)
<i>Wild Type</i>	868
Heterozigoto	868 e 458
Homozigoto recessivo (miotônico)	458

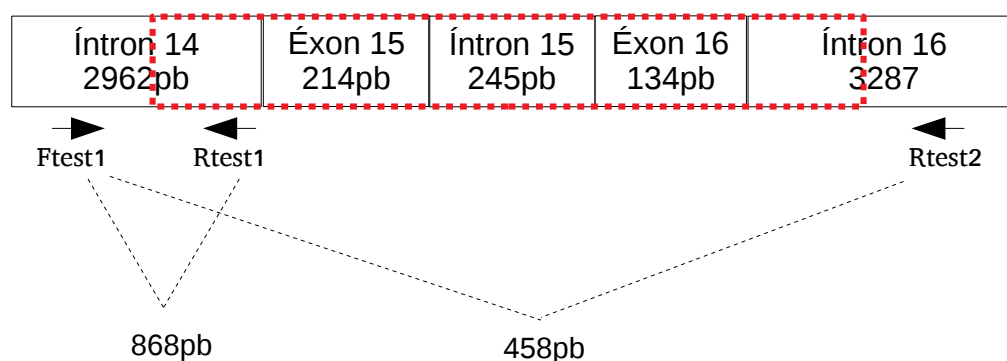


FIGURA 11: Representação esquemática da região entre os íntrons 14 e 16 e os *primers* utilizados no teste de genotipagem. Os retângulos representam os íntrons 14, 15 e 16 e os éxons 15 e 16 com os respectivos tamanhos em pares de base (pb). O retângulo tracejado vermelho representa a região de deleção.

VII.M) EXPRESSÃO RELATIVA DE TRANSCRITOS DO *CLCN1* SUÍNO.

Para avaliar a expressão relativa (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001) dos transcritos X1 e X2 do *CLCN1* entre os suínos normais, afetados e heterozigotos, foram utilizados oligonucleotídeos (Tabela 9) para amplificação de 4 *amplicons*: P8 de 85pb, localizado no éxon 8; P15-16 de 98pb, localizado entre os éxons 15 e 16 do RNAm do gene *CLCN1* suíno (XM_021078561.1), e ainda, o gene normalizador (*housekeeping gene*), Beta actina (XM_021086047.1) de 86pb. Adicionalmente, um segundo ensaio foi realizado, adotando o *amplicon* P14/17 utilizando um oligonucleotídeo iniciador localizado na junção entre o éxon 14 e o éxon 17, nesse ensaio, também foi utilizado o gene normalizador Beta actina.

Foi realizada curva de diluição para cada reação, as otimizações foram realizadas para obtenção de eficiências entre 95 e 105% com no mínimo 4 pontos na curva padrão. A curva de dissociação de cada reação foi verificada quanto a presença de único produto (Figura 12).

Após validação das reações, foram utilizadas amostras de cDNA de 3 animais *wild types*, 3 animais heterozigotos e 3 animais homozigotos recessivos. Foi estabelecido o desvio padrão máximo de 0,5 *cycle threshold* (CT) para cada triplicada.

As reações de qPCR foram realizadas em triplicata, com volume final de 20µl, contendo 200nM de cada oligonucleotídeo iniciador, 2µl de cDNA (aproximadamente 26ng), 10µl de GoTaq® qPCR Master Mix (Applied Biosystems™, USA) e água nuclease *free* q.s.p. Foi utilizado o equipamento 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems™, USA), e as condições da reação foram: desnaturação inicial de 95°C por 10 minutos, seguido de 40 ciclos a 95°C por 15 segundos e 60°C por 60 segundos, e posteriormente realizada a *melting curve*.

TABELA 9: Relação de produtos e respectivos *primers* utilizados nas reações de RTq-PCR.

Nome do produto	Localização do alvo	Tamanho do amplicon (pb)	Sequência do oligonucleotídeo	Tipo
P8	Éxon 8	85	TGCCGTAAGGAACTACTGGC	<i>Forward</i>
			ATCCTTGTTCCACACGGCTA	<i>Reverse</i>
P15-16	Éxons 15-16	98	GGTCAAGAAGCTACCCTACT	<i>Forward</i>
			CAAACCTTCACATCACGTACCA	<i>Reverse</i>
P14/17	Éxon 14 (junção 14/17)	84	CTTCCCGGACGGCATTTTA	<i>Forward</i>
			AGCAGGATCATGGAATCAATG	<i>Reverse</i>
Bact	Éxons 7-9	86	CATTGTCCACCTTCCAGCAGATGT	<i>Forward</i>
			CTAGAAGCATTGCGGTGGACGAT	<i>Reverse</i>

A) VII.N) ANÁLISE DA ESTRUTURA PROTEICA

As sequências de aminoácidos da proteína *CLC1* dos animais normais e dos animais afetados, foram inferidas utilizando a ferramenta *translate* do programa Geneious® versão 10.2.3 (Biomatters, Auckland-New Zealand), considerando a fase de leitura 1 a partir do códon iniciador ATG (KEARSE ET AL. 2012). Para isso foram utilizadas as sequências obtidas na presente pesquisa, referentes a sequência codificante (mRNA) do gene *CLCN1* dos animais normais (*wild type*) e dos homozigotos recessivos.

As sequências proteicas obtidas foram alinhadas entre si e comparadas às sequências de referência das isoformas X1 (XP_020934220.1) e X2 (XP_020934221.1) do *CLC1* suíno, disponíveis no banco de dados *Reference sequence* (RefSeq) do *National National Center for Biotechnology Information* - NCBI.

A sequência referência da isoforma X1 (XP_020934220.1) dos suínos foi alinhada com a sequência referência da isoforma X1 (NP_000074) humana, e com a sequência *CLC1* de outras 14 espécies de mamíferos diferentes, para verificar regiões conservadas entre as espécies (Tabela 10).

TABELA 10: Identificação das sequências utilizadas para alinhamento da proteína CLC1 de 14 espécies de mamíferos.

Número da sequência no alinhamento	Número de acesso Refseq - ncbi	Espécie	Isoforma
1	NP_000074	Homo sapiens	X1
2	XP_020934220	Sus scrofa	X1
3	NP_001291956.1	Felis catus	-
4	NP_001003124.1	Canis lupus familiaris	-
5	NP_001277845.1	Bubalus bubalis	-
6	NP_038519.1	Mus musculus	-
7	NP_037279.1	Rattus norvegicus	-
8	XP_019814784.1	Bos indicus	X1
9	XP_016813811.1	Pan troglodytes	X1
10	XP_013819008.1	Capra hircus	X1
11	XP_004008185.3	Ovis aries	X1
12	XP_001915671.2	Equus caballus	-
13	XP_017527433.1	Manis javanica	-
14	XP_012877091.1	Dipodomys ordii	-
15	XP_004474189.1	Dasyurus novemcinctus	-

A estrutura terciária do *CLC1* dos suínos *wild type* (*CLC1_WT*) foi modelada por homologia, utilizando os moldes disponíveis no banco de dados *Protein Data Bank* (www.rcsb.org). Os modelos utilizados foram: a estrutura cristalizada do canal de cloro *CLC* de *Escherichia coli* PDB ID: 1KPK (DUTZLER ET AL. 2002); a estrutura do canal de cloro da *Cyanidioschyzon merolae*, *CmCLC* (*Protein Data Bank* - 3ORG) (FENG ET AL. 2010); e a estrutura do canal de cloro *CLC-K* bovino PDB ID: 5TQQ (PARK; CAMPBELL; MACKINNON, 2017). Para isso, a sequência predita de aminoácidos do *CLC* obtida dos animais *wild type* (*CLC_WT*) foi submetida ao programa Modeller® (ŠALI; BLUNDELL, 1993) e à ferramenta online Swiss-Model® (Protein Structure Bioinformatics Group) (BIASINI et al., 2014).

Utilizando o programa Modeller® foram pretendidas as estruturas com *score* GA341 igual a 1.0 e menores valores de *score* DOPE (*Discrete Optimized Energy*) e MolPDF. Utilizando a ferramenta Swiss-Model® foram avaliados os valores de GMQE (*Global Model Quality Estimation*), com preferência para os valores mais próximo de 1; QMEAN (*Qualitative Model Energy Analysis*) desconsiderando os valores menores que -4; e avaliando também, os valores de *Global Quality Estimate*, *Local Quality Estimate* e de *Comparison* (ŠALI; BLUNDELL, 1993; SWISS-MODEL,

2017). Todas as estruturas geradas também foram analisadas pela ferramenta ProSa-web (WIEDERSTEIN; SIPPL, 2007). Os valores de *Z-score* foram avaliados quanto à proximidade dos valores de proteínas nativas de mesmo tamanho molecular. O gráfico de energia gerado para cada modelo foi avaliado quanto a presença de valores positivos (WIEDERSTEIN AND SIPPL 2007). A estrutura melhor avaliada foi submetida ao software Swiss-PDB Viewer 4.1.0 para otimização manual, de acordo com o modelo utilizado (GUEx; PEITSCH, 1997). Ao fim o programa Chimera foi utilizado para visualização e geração de imagens das estruturas geradas (ATKINSON; SWIFT; LEQUIRE, 1981; PETTERSEN et al., 2004).

Todos os procedimentos realizados nessa pesquisa, foram previamente aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da FMVZ-UNESP sob protocolo nº 169/2015 (anexo 1).

RESULTADOS

VIII. RESULTADOS

VIII.A) EXAME CLÍNICO

Os 22 animais pertencentes a família de miotônicos eram mantidos em baias protegidos da luz solar ou em piquetes. Eram arraçoados com ração comercial para suínos e fornecida água *ad libitum*.

Dos 22 animais pertencentes à família de miotônicos, 9 apresentavam os sinais clínicos de miotonia hereditária. Os sinais clínicos verificados a partir de uma semana de vida e aumentavam em intensidade com o avançar da idade. Esses sinais incluíam hipertrofia muscular (Figura 12), miotonia, andar rígido, capacidade de flexão dos membros diminuída e rigidez muscular intensa responsiva a estímulos (*startle response*) seguida de decúbito (Figura 13) que permanecia por tempo geralmente inferior a um minuto e em casos mais intensos o decúbito durava até dois minutos. A rigidez muscular intensa ocorria após os animais serem estimulados a andar e era mais evidente quando os estímulos ocorriam após momentos de repouso e/ou com pouca movimentação prévia. A miotonia diminuía de intensidade conforme a atividade muscular era mantida, ocorrendo o fenômeno *warm up*. Embora os animais vocalizassem durante os episódios de queda e decúbito, não foi possível avaliar a presença de dor.

Dentre os animais jovens, 3 afetados que conviviam em um grupo com mais 8 animais saudáveis da mesma idade, apresentavam atraso no crescimento, essa característica foi correlacionada com a dificuldade desses animais de se aproximarem do cocho, onde era fornecido o alimento para toda a leitegada, devido à deficiência na locomoção causada pela miotonia. Não foi verificada nenhuma anormalidade compatível com alterações encefálicas, e demais parâmetros do exame físico estavam normais.

Houve variação na intensidade dos sinais clínicos. Entre os animais afetados 2 apresentavam a rigidez muscular mais intensa decorrente de estímulos e as quedas devido à rigidez muscular eram facilmente desencadeadas com pouco estímulo ambiental. Esses animais

permaneciam em decúbito por tempo superior a um minuto. Outros dois animais apresentaram uma forma leve de rigidez muscular decorrente do *startle response* e não apresentavam decúbito decorrente da rigidez. Considerando essa heterogeneidade fenotípica, os suínos afetados podem ser classificados em três níveis de intensidade dos sinais clínicos conforme demonstrado na tabela 11, vale salientar que essa intensidade era progressiva com o avançar da idade desses animais.

TABELA 11: Classificação da intensidade dos principais sinais clínicos verificados nos suínos afetados por miotonia hereditária.

Intensidade	Hipertrofia muscular	Rigidez muscular	<i>Startle response</i> seguido de decúbito
Leve	evidente	+	-
Moderado	evidente	+	+
Intenso	evidente	++	++

Rigidez muscular: + moderada, ++ intensa.

Startle response seguido de decúbito: - ausente, + tempo de decúbito menor que um minuto, ++ tempo de decúbito maior que 1 minuto.

Dentre os afetados, três animais adultos que apresentavam a forma intensa de miotonia, vieram a óbito decorrente às crises de rigidez muscular ocorridas nos piquetes sem abrigo do sol. Ao exame de necrópsia além da hipertrofia muscular esquelética não foram observadas anormalidades adicionais.



FIGURA 12: A - posterior de dois animais afetados pela miotonia hereditária. Note a hipertrofia muscular evidente no membro pélvico. B - vista lateral demonstrando hipertrofia muscular evidente no membro pélvico esquerdo. C - destaque para membro pélvico esquerdo com evidente hipertrofia e rigidez musculares com formação de *dimples*.



FIGURA 13: Sequência de imagens obtidas a partir de um vídeo demonstrando dois animais afetados. Note a hipertrofia muscular e o episódio de rigidez muscular intensa após estímulo sonoro de bater de palmas, seguida de queda e decúbito (quadros de 1 a 7). Em seguida os animais se recuperam da rigidez intensa e conseguem levantar (quadros 8 a 16). No filme, o intervalo de tempo entre a primeira e última imagens foi de 8 segundos.

VIII.B) HEREDOGRAMA

A anamnese possibilitou a construção de um heredograma (Figura 14) que permite verificar um padrão de herança autossômico recessivo, e também, apontar o provável ancestral comum disseminador do defeito genético, animal n° 18.

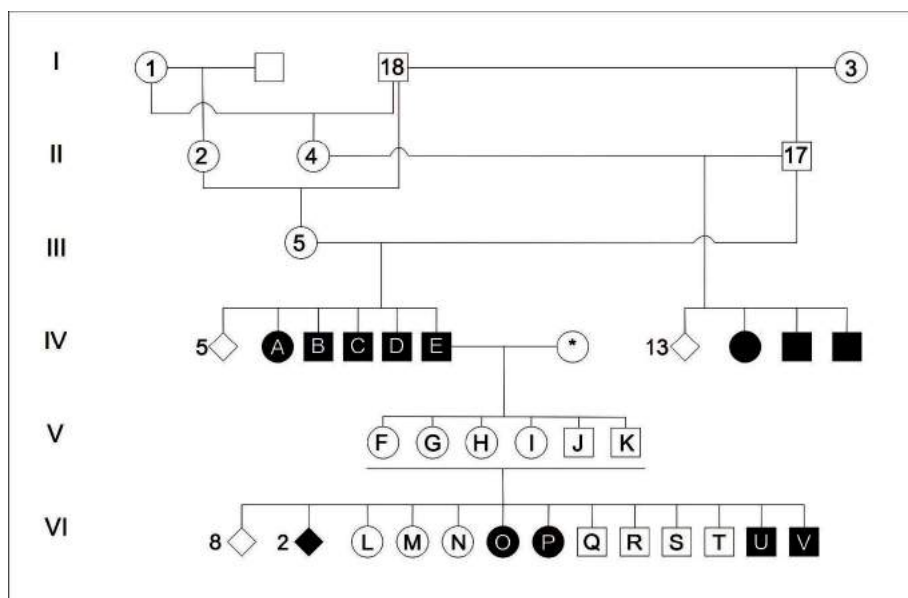


FIGURA 14: Heredograma construído a partir do histórico familiar dos animais experimentais (A -V). Note que o ancestral comum n° 18 é pai dos indivíduos 4, 5 e 17, esses por sua vez, acasalaram entre si produzindo animais afetados pela miotonia hereditária. * Porca Large White sem ancestral comum com a família.

VIII.C) BIOQUÍMICA

Os exames de bioquímica sérica evidenciaram valores acima da referência para a espécie para AST, ALT, DHL e CK para os animais avaliados em todos momentos. Os valores de FA, GGT, Uréia, Creatinina, BT, BD e BI estavam dentro da faixa de referência para a espécie (Tabela 12).

TABELA 12: Valores absolutos e médias obtidas e nos exames de bioquímica sérica de 4 animais afetados (A-D).

M	ID	AST (UI/L)	ALT (UI/L)	FA (UI/l)	Ureia mg/ dL	Crea mg/ dl	GGT UI/L	DHL UI/L	CK UI/l	BT mg/ dl	BD mg/ dl	Bl. mg/dl
1	A	60*	87*	-	39	1,3	23	1327*	89*	-	-	-
	B	40*	66*	-	41	1,5	15	888*	48*	-	-	-
	C	53*	85*	-	42	1,6	30	1216*	100*	-	-	-
	D	59*	61*	-	37	1,2	21,8	1267*	70*	-	-	-
2	A	47*	-	395	28	0,9	22	943*	363*	0,2	0,1	0,1
	B	110*	-	73	37	1	29	1126*	626*	0,2	0,2	0
	C	71*	-	81	34	0,9	27	1140*	340*	0,1	0	0,1
	D	29*	-	92	26	0,8	15	862*	203*	0,2	0,1	0,1
Média		58,63 *	74,75 *	160, 25	35,5	1,15	22,85	1096, 13*	229, 88*	0,18	0,1	0,08
Ref		8,2 a 21,6	31 a 58	118 a 395	21,4 a 61,2	1 a 2,7	10 a 60	380 a 634	2,4 a 22,5	0 a 0,6	0 a 0,3	0 a 0,3

M- momento, REF-Valor de referência para a espécie suína, * para os valores acima dos valores de referência. - para valores não mensurados.

VIII.D) HISTOPATOLOGIA

Na análise de tecido muscular dos animais afetados não foi constatada distrofia muscular. As fibras musculares estavam distribuídas com um padrão homogêneo, com núcleos periféricos e tecido conjuntivo normalmente distribuído. Entretanto, foi verificado que algumas fibras musculares dos animais afetados possuem maior tamanho (hipertrofia) que as fibras musculares dos animais normais. Apesar disso, não foram verificadas alterações adicionais nas amostras de animais miotônicos.

VIII.E) ELETROMIOGRAFIA

Ao exame de EMG dos quatro animais afetados, todos apresentaram descargas miotônicas típicas desencadeadas pela inserção ou movimento do eletrodo (Figura 15). Essas descargas foram verificadas em todos os músculos examinados dos 4 membros. Também foi verificado o ruído característico de avião de bombardeio.

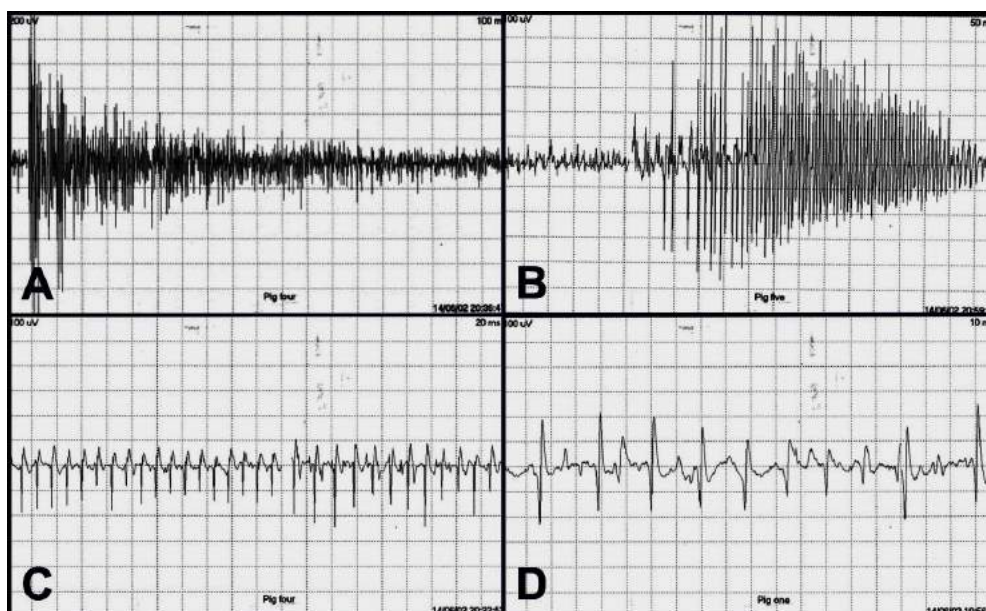


FIGURA 15: Traçado eletromiográfico de animais afetados. Os eixos vertical e horizontal são para intensidade (uV) e tempo (mSec/div). A - B = Descargas miotônicas típicas, que diminuem em amplitude e frequência, tempo de análise de 100 e 50 mSec/div respectivamente. C = Sequência sustentada de ondas positivas, com pico inicial positivo seguido por um componente negativo lento, tempo de análise de 20mSec/div. D = Sequência sustentada de picos negativos com uma positividade inicial, tempo de análise 10mSec/div.

ANÁLISE MOLECULAR

VIII.F) ANÁLISE *IN SILICO* DAS SEQUÊNCIAS DAS ISOFORMAS X1 E X2 DO *CLC1* SUÍNO

A submissão das sequências de nucleotídeos referentes aos transcritos da proteína *CLC-1* da espécie suína (*Sus scrofa*) X1 (XM_021078561.1) e X2 (XM_021078562.1) para a ferramenta *online* BLAST (Basic Local Alignment Search Tool, <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), resultou no alinhamento de 191 sequências de diferentes organismos, dos quais 184 são homólogas para X1, e 5 homólogas para X2. Os valores de cobertura, identidade, E-value para cada sequência em relação à sequência X2 do suíno estão listados na tabela 13.

TABELA 13: Resultados do alinhamento das sequências homólogas para a sequência de RNAm transcrito alternativo X2 de suínos (XM_021078562.1)

Sequência	Organismo	Cobertura (%)	Identidade (%)	E-value	Número de acesso
X2	<i>Bos taurus</i>	58	86	0.0	XM_015470764.1
X3	<i>Bos indicus</i>	47	89	0.0	XM_019959227.1
X4	<i>Cercocebus atys</i>	55	84	0.0	XM_012057525.1
1	<i>Bison bison bison</i>	45	89	0.0	XM_010834009.1
1	<i>Macaca fascicularis</i>	40	83	0.0	XM_005551037.2

VIII.G) ANÁLISE DAS SEQUÊNCIAS TRANSCRITAS DO *CLCN1*

Utilizando amostras de animais afetados, não foi possível a amplificação de produtos que possuíam oligonucleotídeos iniciadores alocados nos éxons 15 ou 16. Foram obtidos dois conjuntos de sequências por sequenciamento sanger, 120 sequências de nucleotídeos referentes aos *amplicons* das amostras dos suínos afetados (A, B, C e D) e 72 sequências de nucleotídeos referentes aos *amplicons* utilizando os animais normais (1 e 2).

O alinhamento entre as sequências obtidas com a sequência referência transcrito X1 (XM_021078561.1), possibilitou a verificação de 3 e 12 polimorfismos, respectivamente, para os animais *wild type* e afetados (Tabela 14). Para os animais afetados foi verificada a ausência dos nucleotídeos referentes aos éxon 15 e 16 anotados na variante X1 (Figura 16).

TABELA 14: Polimorfismos existentes nas sequências de cDNA referentes ao gene CLCN1 suíno, obtidas de animais miotônicos e *wild types*, comparadas a sequência referência variante X1 (XM_021078561.1).

Códon Ref X1 XM_021078561.1	WILD TYPE	MIOTÔNICO O	Aminoácido codificado	Localização	Posição à partir do ATG inicial
GAC	GAC	<u>GAT</u>	Ácido aspártico	Éxon 2	225
ATG	ATG	<u>GTG</u> *	Metionina>Valin a	Éxon 2	226
GCA	GCA GGY	<u>GCT</u>	Alanina	Éxon 8	978
GGT	(C/T)	<u>GGC</u>	Glicina	Éxon 10	1077
CCG	CCG	<u>CCA</u>	Prolina	Éxon 11	1224
GCT	GCC	<u>GCC</u>	Alanina	Éxon 13	1422
GAC	GAC GGY	<u>GAT</u>	Ácido aspártico	Éxon 14	1524
GGT	(C/T)	ausente	Glicina	Éxon 15	1697
GTG	GTG	<u>GTC</u>	Ácido aspártico	Éxon 21	2436
GCA	GCA	<u>GTA</u> *	Alanina>Valina	Éxon 23	2759
CCA	CCA	<u>CCG</u>	Prolina	Éxon 23	2802
CCG	CCG	<u>CCA</u>	Prolina	Éxon 23	2826
TCA	TCA	<u>TCG</u>	Serina	UTR 3'	2964

* ocorre mudança do aminoácido codificado.

1. XM_021078561.1	AGCATGGAGCCCTCTGAGTCCCAGCGGCGTGGGCGCGAGCAAAGCTGGTGGGGCAGTGCCCCCAGT	1 10 20 30 40 50 60
2. Consensus Wild Type	AGCATGGAGCCCTCTGAGTCCCAGCGGCGTGGGCGCGAGCAAAGCTGGTGGGGCAGTGCCCCCAGT	
3. Consensus Miotonicos	AGCATGGAGCCCTCTGAGTCCCAGCGGCGTGGGCGCGAGCAAAGCTGGTGGGGCAGTGCCCCCAGT	70 80 90 100 110 120 130
1. XM_021078561.1	ACCAGTACATGCCCTTTGAACACTGCACCAGCTACGGACTGCCCTCTGAGAACGGGGGCCTTCAGCA	exon 1
2. Consensus Wild Type	ACCAGTACATGCCCTTTGAACACTGCACCAGCTACGGACTGCCCTCTGAGAACGGGGGCCTTCAGCA	
3. Consensus Miotonicos	ACCAGTACATGCCCTTTGAACACTGCACCAGCTACGGACTGCCCTCTGAGAACGGGGGCCTTCAGCA	140 150 160 170 180 190 200
1. XM_021078561.1	CAGGCTCCGGAGGGATGCGGGACCCGACCCAGTGCCCAACCCACACAGATTTATGGCCATCACAAA	exon 1 exon 2
2. Consensus Wild Type	CAGGCTCCGGAGGGATGCGGGACCCGACCCAGTGCCCAACCCACACAGATTTATGGCCATCACAAA	
3. Consensus Miotonicos	CAGGCTCCGGAGGGATGCGGGACCCGACCCAGTGCCCAACCCACACAGATTTATGGCCATCACAAA	210 220 230 240 250 260
1. XM_021078561.1	GAGCAGTTCTCAGACAAGGAGCCAGACATGGGGATGCCCGAGAAGATGGGCTCCAGTTCTTCCGTGG	exon 2
2. Consensus Wild Type	GAGCAGTTCTCAGACAAGGAGCCAGACATGGGGATGCCCGAGAAGATGGGCTCCAGTTCTTCCGTGG	
3. Consensus Miotonicos	GAGCAGTTCTCAGACAAGGAGCCAGACATGGGGATGCCCGAGAAGATGGGCTCCAGTTCTTCCGTGG	270 280 290 300 310 320 330
1. XM_021078561.1	ACAGCAAGGATGAGGACCGCTATTCTAAATGTCAAGGTTGTATCCACCGAATGGGACTTGTAGTGAG	exon 2 exon 3
2. Consensus Wild Type	ACAGCAAGGATGAGGACCGCTATTCTAAATGTCAAGGTTGTATCCACCGAATGGGACTTGTAGTGAG	
3. Consensus Miotonicos	ACAGCAAGGATGAGGACCGCTATTCTAAATGTCAAGGTTGTATCCACCGAATGGGACTTGTAGTGAG	340 350 360 370 380 390 400
1. XM_021078561.1	AAGAAAATTAGGGGAAGACTGGATCTTTTTGGTGCTCCTGGGGCTACTAATGGCTCTGGTCAGCTGG	exon 3
2. Consensus Wild Type	AAGAAAATTAGGGGAAGACTGGATCTTTTTGGTGCTCCTGGGGCTACTAATGGCTCTGGTCAGCTGG	
3. Consensus Miotonicos	AAGAAAATTAGGGGAAGACTGGATCTTTTTGGTGCTCCTGGGGCTACTAATGGCTCTGGTCAGCTGG	410 420 430 440 450 460
1. XM_021078561.1	TGCATGGATTATGTCAGTGCCAAAAGCCTTCAGGCCTACAAGTGGACCTACTACCAGATGCAGCCCA	exon 3 exon 4
2. Consensus Wild Type	TGCATGGATTATGTCAGTGCCAAAAGCCTTCAGGCCTACAAGTGGACCTACTACCAGATGCAGCCCA	
3. Consensus Miotonicos	TGCATGGATTATGTCAGTGCCAAAAGCCTTCAGGCCTACAAGTGGACCTACTACCAGATGCAGCCCA	470 480 490 500 510 520 530
1. XM_021078561.1	ACCTGCCTCTGCAGTTCTGGTCTGGGTACCTTCCCCCTCGTCCCTCATCTCTTCAGCGCCCTCTT	exon 4
2. Consensus Wild Type	ACCTGCCTCTGCAGTTCTGGTCTGGGTACCTTCCCCCTCGTCCCTCATCTCTTCAGCGCCCTCTT	
3. Consensus Miotonicos	ACCTGCCTCTGCAGTTCTGGTCTGGGTACCTTCCCCCTCGTCCCTCATCTCTTCAGCGCCCTCTT	540 550 560 570 580 590 600
1. XM_021078561.1	CTGCCACCTCATCTCCCCTCAGGCTGTGCGGCTTGGAATCCCTGAAATGAAGACCATACTTCGCGGG	exon 4 exon 5
2. Consensus Wild Type	CTGCCACCTCATCTCCCCTCAGGCTGTGCGGCTTGGAATCCCTGAAATGAAGACCATACTTCGCGGG	
3. Consensus Miotonicos	CTGCCACCTCATCTCCCCTCAGGCTGTGCGGCTTGGAATCCCTGAAATGAAGACCATACTTCGCGGG	610 620 630 640 650 660 670
1. XM_021078561.1	GTTGTCTGAAGGAATACCTCACCTCAAGGCCTTTGTGGCCAAGGTTGTGGCCCTGACCGCGGGGC	exon 5
2. Consensus Wild Type	GTTGTCTGAAGGAATACCTCACCTCAAGGCCTTTGTGGCCAAGGTTGTGGCCCTGACCGCGGGGC	
3. Consensus Miotonicos	GTTGTCTGAAGGAATACCTCACCTCAAGGCCTTTGTGGCCAAGGTTGTGGCCCTGACCGCGGGGC	680 690 700 710 720 730
1. XM_021078561.1	TGGGCAGTGGCATCCCCGTGGGGAAGGAGGGCCCTTTTGTCCACATTGCCAGCATCTGCGCTGCTGT	exon 5 exon 6
2. Consensus Wild Type	TGGGCAGTGGCATCCCCGTGGGGAAGGAGGGCCCTTTTGTCCACATTGCCAGCATCTGCGCTGCTGT	
3. Consensus Miotonicos	TGGGCAGTGGCATCCCCGTGGGGAAGGAGGGCCCTTTTGTCCACATTGCCAGCATCTGCGCTGCTGT	740 750 760 770 780 790 800
1. XM_021078561.1	CCTCAGCAAGTTCATGTCGGTTTTCTGTGGGGTGTATGAGCAGCCATACTATTACACTGACATGCTG	exon 6 exon 7
2. Consensus Wild Type	CCTCAGCAAGTTCATGTCGGTTTTCTGTGGGGTGTATGAGCAGCCATACTATTACACTGACATGCTG	
3. Consensus Miotonicos	CCTCAGCAAGTTCATGTCGGTTTTCTGTGGGGTGTATGAGCAGCCATACTATTACACTGACATGCTG	810 820 830 840 850 860 870
1. XM_021078561.1	ACGGTGGGCTGTGCCGTAGGAGTCGGCTGTTGTTTTGGGACACCACTTGGAGGAGTGTGTTTAGCA	exon 7 exon 8
2. Consensus Wild Type	ACGGTGGGCTGTGCCGTAGGAGTCGGCTGTTGTTTTGGGACACCACTTGGAGGAGTGTGTTTAGCA	
3. Consensus Miotonicos	ACGGTGGGCTGTGCCGTAGGAGTCGGCTGTTGTTTTGGGACACCACTTGGAGGAGTGTGTTTAGCA	880 890 900 910 920 930
1. XM_021078561.1	TCGAGGTCACCTCTACCTACTTTGCCGTAAGGAACACTGGCGAGGATTCTTTCGGGCCACCTTCAG	exon 8
2. Consensus Wild Type	TCGAGGTCACCTCTACCTACTTTGCCGTAAGGAACACTGGCGAGGATTCTTTCGGGCCACCTTCAG	
3. Consensus Miotonicos	TCGAGGTCACCTCTACCTACTTTGCCGTAAGGAACACTGGCGAGGATTCTTTCGGGCCACCTTCAG	

	940	950	960	970	980	990	1,000
1. XM_021078561.1	TGCCTTCGTTTTCCGAGTGTAGCCGTGTGGAACAAGGATGCAGTCACCATCACGGCTCTCTTCAGA						
2. Consensus Wild Type	TGCCTTCGTTTTCCGAGTGTAGCCGTGTGGAACAAGGATGCAGTCACCATCACGGCTCTCTTCAGA						
3. Consensus Miotonicos	TGCCTTCGTTTTCCGAGTGTAGCCGTGTGGAACAAGGATGCAGTCACCATCACGGCTCTCTTCAGA						
	1,010	1,020	1,030	1,040	1,050	1,060	1,070
1. XM_021078561.1	ACCAACTTCCGAATGGATTTCCCTTTGACCTGCAGGAGCTCCCAGCCTTTGCAGTCATCGGGATTT						
2. Consensus Wild Type	ACCAACTTCCGAATGGATTTCCCTTTGACCTGCAGGAGCTCCCAGCCTTTGCAGTCATCGGGATTT						
3. Consensus Miotonicos	ACCAACTTCCGAATGGATTTCCCTTTGACCTGCAGGAGCTCCCAGCCTTTGCAGTCATCGGGATTT						
	1,080	1,090	1,100	1,110	1,120	1,130	
1. XM_021078561.1	GCTGTGGTTTCCTGGGAGCTGTGTTTGTCTACCTGCATCGCCAGGTCATGCTCGGTGTCCGAAAGCA						
2. Consensus Wild Type	GCTGTGGTTTCCTGGGAGCTGTGTTTGTCTACCTGCATCGCCAGGTCATGCTCGGTGTCCGAAAGCA						
3. Consensus Miotonicos	GCTGTGGTTTCCTGGGAGCTGTGTTTGTCTACCTGCATCGCCAGGTCATGCTCGGTGTCCGAAAGCA						
	1,140	1,150	1,160	1,170	1,180	1,190	1,200
1. XM_021078561.1	CAAGGGCCTCAGCCAGTTTCTGGCTAAGCACCAGCCTGCTCTATCCTGGAATCGTGACCTTTGTCATT						
2. Consensus Wild Type	CAAGGGCCTCAGCCAGTTTCTGGCTAAGCACCAGCCTGCTCTATCCTGGAATCGTGACCTTTGTCATT						
3. Consensus Miotonicos	CAAGGGCCTCAGCCAGTTTCTGGCTAAGCACCAGCCTGCTCTATCCTGGAATCGTGACCTTTGTCATT						
	1,210	1,220	1,230	1,240	1,250	1,260	1,270
1. XM_021078561.1	GCCTCATTACCTTCCCACCGGGAATAGGTCAATTCATGGCTGGAGAGTTGATGCCTCGTGAAGCCA						
2. Consensus Wild Type	GCCTCATTACCTTCCCACCGGGAATAGGTCAATTCATGGCTGGAGAGTTGATGCCTCGTGAAGCCA						
3. Consensus Miotonicos	GCCTCATTACCTTCCCACCGGGAATAGGTCAATTCATGGCTGGAGAGTTGATGCCTCGTGAAGCCA						
	1,280	1,290	1,300	1,310	1,320	1,330	1,340
1. XM_021078561.1	TCAGTACCCTGTTTGACAACCATACTGGGTAACATGTGGGGGACCCCGAGAGCCTGGGCCGGTC						
2. Consensus Wild Type	TCAGTACCCTGTTTGACAACCATACTGGGTAACATGTGGGGGACCCCGAGAGCCTGGGCCGGTC						
3. Consensus Miotonicos	TCAGTACCCTGTTTGACAACCATACTGGGTAACATGTGGGGGACCCCGAGAGCCTGGGCCGGTC						
	1,350	1,360	1,370	1,380	1,390	1,400	
1. XM_021078561.1	GGCTGTGTGGATCCACCCAAAAGTCAACGTGGTCTGGTTCATCCTCTTCTTCATCATGAAGTTC						
2. Consensus Wild Type	GGCTGTGTGGATCCACCCAAAAGTCAACGTGGTCTGGTTCATCCTCTTCTTCATCATGAAGTTC						
3. Consensus Miotonicos	GGCTGTGTGGATCCACCCAAAAGTCAACGTGGTCTGGTTCATCCTCTTCTTCATCATGAAGTTC						
	1,410	1,420	1,430	1,440	1,450	1,470	
1. XM_021078561.1	TGGATGTCCATCGTGGCTACCCTATGCCCATACCCTGCGGAGGCTTCATGCCTGTGTTTGTGCTCG						
2. Consensus Wild Type	TGGATGTCCATCGTGGCTACCCTATGCCCATACCCTGCGGAGGCTTCATGCCTGTGTTTGTGCTCG						
3. Consensus Miotonicos	TGGATGTCCATCGTGGCTACCCTATGCCCATACCCTGCGGAGGCTTCATGCCTGTGTTTGTGCTCG						
	1,480	1,490	1,500	1,510	1,520	1,530	1,540
1. XM_021078561.1	GAGCTGCGTTTCGGAAGGCTGGTGGGAGAGATCATGGCCATGCTCTTCCCGACGGCATTATTTTGA						
2. Consensus Wild Type	GAGCTGCGTTTCGGAAGGCTGGTGGGAGAGATCATGGCCATGCTCTTCCCGACGGCATTATTTTGA						
3. Consensus Miotonicos	GAGCTGCGTTTCGGAAGGCTGGTGGGAGAGATCATGGCCATGCTCTTCCCGAAGGCATTATTTTGA						
	1,550	1,560	1,570	1,580	1,590	1,600	
1. XM_021078561.1	TGACATCATCTACAAGATCCTACCTGGGGCTATGCAGTCATTGGAGCAGCAGCGCTGACTGGTGCA						
2. Consensus Wild Type	TGACATCATCTACAAGATCCTACCTGGGGCTATGCAGTCATTGGAGCAGCAGCGCTGACTGGTGCA						
3. Consensus Miotonicos	TGACATCATCTACAAGATCCTACCTGGGGCTATGCAGTCATTGGAGCAGCAGCGCTGACTGGTGCA						
	1,610	1,620	1,630	1,640	1,650	1,660	1,670
1. XM_021078561.1	GTGTCCCACACAGTCTCCACAGCCGTGATTTGCTTCAATTAACGGGTCAGATTGCCACATCCTAC						
2. Consensus Wild Type	GTGTCCCACACAGTCTCCACAGCCGTGATTTGCTTCAATTAACGGGTCAGATTGCCACATCCTAC						
3. Consensus Miotonicos	GTGTCCCACACAGTCTCCACAGCCGTGATTTGCTTCAATTAACGGGTCAGATTGCCACATCCTAC						
	1,680	1,690	1,700	1,710	1,720	1,730	1,740
1. XM_021078561.1	CCATGATGGTGGCTGTTATCTTGGCCAACATGGTGGCTCAGAGCCTGCAGCCCTCCCTTTATGACAG						
2. Consensus Wild Type	CCATGATGGTGGCTGTTATCTTGGCCAACATGGTGGCTCAGAGCCTGCAGCCCTCCCTTTATGACAG						
3. Consensus Miotonicos	CCATGATGGTGGCTGTTATCTTGGCCAACATGGTGGCTCAGAGCCTGCAGCCCTCCCTTTATGACAG						
	1,750	1,760	1,770	1,780	1,790	1,800	
1. XM_021078561.1	CATCATCCAGGTCAAGAAGCTACCCTACTTGCCTGACCTTGGTTGGAACCAGCTCAGCAAATTTACA						
2. Consensus Wild Type	CATCATCCAGGTCAAGAAGCTACCCTACTTGCCTGACCTTGGTTGGAACCAGCTCAGCAAATTTACA						
3. Consensus Miotonicos	CATCATCCAGGTCAAGAAGCTACCCTACTTGCCTGACCTTGGTTGGAACCAGCTCAGCAAATTTACA						
	1,810	1,820	1,830	1,840	1,850	1,860	1,870
1. XM_021078561.1	ATCTTTGTCGAGGACATCATGGTACGTGATGTGAAGTTTGTCTCAGCTTCTTGACAGTATGGGGAGC						
2. Consensus Wild Type	ATCTTTGTCGAGGACATCATGGTACGTGATGTGAAGTTTGTCTCAGCTTCTTGACAGTATGGGGAGC						
3. Consensus Miotonicos	ATCTTTGTCGAGGACATCATGGTACGTGATGTGAAGTTTGTCTCAGCTTCTTGACAGTATGGGGAGC						

	1,880	1,890	1,900	1,910	1,920	1,930	1,940
1. XM_021078561.1	TGCAAAACCTGCTCCAGACCACCACACTCAAGACTTTACCACTGGTTGATTTCGAAAGATTCCATGAT						
	exon 16						exon ...
2. Consensus Wild Type	TGCAAAACCTGCTCCAGACCACCACACTCAAGACTTTACCACTGGTTGATTTCGAAAGATTCCATGAT						
3. Consensus Miotonicos	ATTCCATGAT						
	1,950	1,960	1,970	1,980	1,990	2,000	2,010
1. XM_021078561.1	CCTGCTGGGCTCCGTGGAGCGGTGAGAACTGCAGTCCCTCTTGCAGCGCCACCTGTGCCTGAGCGG						
	exon 17						
2. Consensus Wild Type	CCTGCTGGGCTCCGTGGAGCGGTGAGAACTGCAGTCCCTCTTGCAGCGCCACCTGTGCCTGAGCGG						
3. Consensus Miotonicos	CCTGCTGGGCTCCGTGGAGCGGTGAGAACTGCAGTCCCTCTTGCAGCGCCACCTGTGCCTGAGCGG						
	2,020	2,030	2,040	2,050	2,060	2,070	
1. XM_021078561.1	AGGCTGCGGGCGGCCAGGACATGGCCAGGAAGTTGTCTGAGCTGCCCTTCGATGGCAAGGCTGGGG						
	exon 17						
2. Consensus Wild Type	AGGCTGCGGGCGGCCAGGACATGGCCAGGAAGTTGTCTGAGCTGCCCTTCGATGGCAAGGCTGGGG						
3. Consensus Miotonicos	AGGCTGCGGGCGGCCAGGACATGGCCAGGAAGTTGTCTGAGCTGCCCTTCGATGGCAAGGCTGGGG						
	2,080	2,090	2,100	2,110	2,120	2,130	2,140
1. XM_021078561.1	TGGGGCGCCGTGGCGTCTGGCCGAGGGGCGCCCTGAGTCCTTCGCCTTTGTGGATGAGGACGAGGA						
	exon 17						
2. Consensus Wild Type	TGGGGCGCCGTGGCGTCTGGCCGAGGGGCGCCCTGAGTCCTTCGCCTTTGTGGATGAGGACGAGGA						
3. Consensus Miotonicos	TGGGGCGCCGTGGCGTCTGGCCGAGGGGCGCCCTGAGTCCTTCGCCTTTGTGGATGAGGACGAGGA						
	2,150	2,160	2,170	2,180	2,190	2,200	2,210
1. XM_021078561.1	TGAGGATGTCTGCGGGAAGCCCGAGCCCTCTCCTTTGACTCCTCCTCTTCCCTTTTCCACTGCTCCA						
	exon 17			exon 18			
2. Consensus Wild Type	TGAGGATGTCTGCGGGAAGCCCGAGCCCTCTCCTTTGACTCCTCCTCTTCCCTTTTCCACTGCTCCA						
3. Consensus Miotonicos	TGAGGATGTCTGCGGGAAGCCCGAGCCCTCTCCTTTGACTCCTCCTCTTCCCTTTTCCACTGCTCCA						
	2,220	2,230	2,240	2,250	2,260	2,270	
1. XM_021078561.1	CTGCACCCTGAAGAGCCCAATGGGCCCTGCCAGCCCAAGCAGCAGCCGGAAGCACCAGAGCCTG						
	exon 18						
2. Consensus Wild Type	CTGCACCCTGAAGAGCCCAATGGGCCCTGCCAGCCCAAGCAGCAGCCGGAAGCACCAGAGCCTG						
3. Consensus Miotonicos	CTGCACCCTGAAGAGCCCAATGGGCCCTGCCAGCCCAAGCAGCAGCCGGAAGCACCAGAGCCTG						
	2,280	2,290	2,300	2,310	2,320	2,330	2,340
1. XM_021078561.1	CAGGTCAAAGACCCTCTGTCTTTTCGGACCCTGTGCGCTGCTTGTGGGAGAGCTCGTCCCACAAA						
	exon 19						
2. Consensus Wild Type	CAGGTCAAAGACCCTCTGTCTTTTCGGACCCTGTGCGCTGCTTGTGGGAGAGCTCGTCCCACAAA						
3. Consensus Miotonicos	CAGGTCAAAGACCCTCTGTCTTTTCGGACCCTGTGCGCTGCTTGTGGGAGAGCTCGTCCCACAAA						
	2,350	2,360	2,370	2,380	2,390	2,400	2,410
1. XM_021078561.1	GAAAAAACCCACCCAGGAGCCAGTGGATTTAGTGGATAACATGTCCCCTGAAGACATTGAGGCCTGG						
	exon 19			exon 20		exon 21	
2. Consensus Wild Type	GAAAAAACCCACCCAGGAGCCAGTGGATTTAGTGGATAACATGTCCCCTGAAGACATTGAGGCCTGG						
3. Consensus Miotonicos	GAAAAAACCCACCCAGGAGCCAGTGGATTTAGTGGATAACATGTCCCCTGAAGACATTGAGGCCTGG						
	2,420	2,430	2,440	2,450	2,460	2,470	
1. XM_021078561.1	GAGCGGGAGCAGCTGAGCCAACCTGTGTGTTTTGACTGCTGTTGTATCGACCAGTCCCCCTCCAGC						
	exon 21						
2. Consensus Wild Type	GAGCGGGAGCAGCTGAGCCAACCTGTGTGTTTTGACTGCTGTTGTATCGACCAGTCCCCCTCCAGC						
3. Consensus Miotonicos	GAGCGGGAGCAGCTGAGCCAACCTGTGTGTTTTGACTGCTGTTGTATCGACCAGTCCCCCTCCAGC						
	2,480	2,490	2,500	2,510	2,520	2,530	2,540
1. XM_021078561.1	TGGTGGAGCAGACGTCTCTGCACAAGACTCACACCCTGTTCTCGCTCTTGGGCTCCACCTTGCTTA						
	exon 21			exon 22			
2. Consensus Wild Type	TGGTGGAGCAGACGTCTCTGCACAAGACTCACACCCTGTTCTCGCTCTTGGGCTCCACCTTGCTTA						
3. Consensus Miotonicos	TGGTGGAGCAGACGTCTCTGCACAAGACTCACACCCTGTTCTCGCTCTTGGGCTCCACCTTGCTTA						
	2,550	2,560	2,570	2,580	2,590	2,600	2,610
1. XM_021078561.1	TGTGACCAGCATGGGGAAGCTCAGGGGTGTGCTGGCCTTGAGGAGCTCCAGAAGGCCATCGAGGGG						
	exon 22			exon 23			
2. Consensus Wild Type	TGTGACCAGCATGGGGAAGCTCAGGGGTGTGCTGGCCTTGAGGAGCTCCAGAAGGCCATCGAGGGG						
3. Consensus Miotonicos	TGTGACCAGCATGGGGAAGCTCAGGGGTGTGCTGGCCTTGAGGAGCTCCAGAAGGCCATCGAGGGG						
	2,620	2,630	2,640	2,650	2,660	2,670	2,680
1. XM_021078561.1	CACACAAAGTCCGGGTGCAACTCCGCCACCCCTTGCCAGCTTCCGGAGTACCACTTCGACTCGAA						
	exon 23						
2. Consensus Wild Type	CACACAAAGTCCGGGTGCAACTCCGCCACCCCTTGCCAGCTTCCGGAGTACCACTTCGACTCGAA						
3. Consensus Miotonicos	CACACAAAGTCCGGGTGCAACTCCGCCACCCCTTGCCAGCTTCCGGAGTACCACTTCGACTCGAA						
	2,690	2,700	2,710	2,720	2,730	2,740	
1. XM_021078561.1	AGACTCCTGGGGCCCCGCTCCCTCCTGCAGAGGCTTGACCATGCCTGATGATGGAACGGGGGCCAC						
	exon 23						
2. Consensus Wild Type	AGACTCCTGGGGCCCCGCTCCCTCCTGCAGAGGCTTGACCATGCCTGATGATGGAACGGGGGCCAC						
3. Consensus Miotonicos	AGACTCCTGGGGCCCCGCTCCCTCCTGCAGAGGCTTGACCATGCCTGATGATGGAACGGGGGCCAC						
	2,750	2,760	2,770	2,780	2,790	2,800	2,810
1. XM_021078561.1	TAGTGCAGGGGATGCAGCTCCTGACTCCCCAGAGACCCTGTGCCATCCCCATCCCCAGAGCCCCCT						
	exon 23						
2. Consensus Wild Type	TAGTGCAGGGGATGCAGCTCCTGACTCCCCAGAGACCCTGTGCCATCCCCATCCCCAGAGCCCCCT						
3. Consensus Miotonicos	TAGTGCAGGGGATGAGCTCCTGACTCCCCAGAGACCCTGTGCCATCCCCATCCCCAGAGCCCCCT						

		2,820	2,830	2,840	2,850	2,860	2,870	2,880
1. XM_021078561.1	CTCTCCCGGGCTCCGGCCAAGGCAGAGAGCGAGCTGGAGGAGCTGGAGCTGGCGGAGAGTCCGGGGC	 exon 23						
2. Consensus Wild Type	CTCTCCCGGGCTCCGGCCAAGGCAGAGAGCGAGCTGGAGGAGCTGGAGCTGGCGGAGAGTCCGGGGC							
3. Consensus Miotonicos	CTCTCCCGGGCTCCGGCCAAGGCAGAGAGCGAGCTGGAGGAGCTGGAGCTGGCGGAGAGTCCGGGGC	2,890	2,900	2,910	2,920	2,930	2,940	
1. XM_021078561.1	CGGAAGAGGAGCTGGCTGACATCTTGCAGGGCCCCAGTCTGCGTCTCACCGACGAGGAGGATGAGGA	 exon 23						
2. Consensus Wild Type	CGGAAGAGGAGCTGGCTGACATCTTGCAGGGCCCCAGTCTGCGTCTCACCGACGAGGAGGATGAGGA							
3. Consensus Miotonicos	CGGAAGAGGAGCTGGCTGACATCTTGCAGGGCCCCAGTCTGCGTCTCACCGACGAGGAGGATGAGGA	2,950	2,960	2,970	2,980	2,990	3,000	3,010
1. XM_021078561.1	CGAACTGATCCTTTGATCATCGCCTGGCCCTCCTCATCGATGGTCCAGAGACCCAGGCTAGAGGGTG	 exon 23						
2. Consensus Wild Type	CGAACTGATCCTTTGATCATCGCCTGGCCCTCCTCATCGATGGTCCAGAGACCCAGGCTAGAGGGTG							
3. Consensus Miotonicos	CGAACTGATCCTTTGATCATCGCCTGGCCCTCCTCATCGATGGTCCAGAGACCCAGGCTAGAGGGTG	3,020	3,030	3,040	3,050			
1. XM_021078561.1	GGCCTGTGGGGGAGAGGGTATTTCTAAAGTGGGA							
2. Consensus Wild Type	GGCCTGTGGGGGAGAGGGTATTTCTAAAGTGGGA							
3. Consensus Miotonicos	GGCCTGTGGGGGAGAGGGTATTTCTAAAGTGGGA							

FIGURA 16: Alinhamento entre as sequências consensus dos animais afetados (Consensus Miotonicos), *wild types* (Consensus *Wild Type*) e a sequência referência transcrito X1 (XM_021078461.1). A sequência referência X1 aparece no topo de cada linha do sequenciamento, logo abaixo estão anotados os éxon (setas largas cinzas). Em azul, respectivamente, 3 e 12 polimorfismos encontrados, comparando os animais afetados e *wild types* com a sequência referência X1. Os ■ demonstram a ausência dos nucleotídeos referentes aos éxon 15 e 16 somente nas sequências dos animais afetados.

VIII.H) SEQUENCIAMENTO DA REGIÃO ENTRE OS ÍNTRONS 14 E 16

A partir dos produtos amplificados utilizando amostras de DNA de animais afetados, foram obtidas 38 sequências pelo método Sanger. As sequências alinhadas com a sequência de referência *CLCN1* suíno (NC_010460.4) evidenciaram a presença de 22 polimorfismos no íntron 14; uma inserção de quatro nucleotídeos (ATCG) na posição 23616 a partir do ATG, localizada no íntron 14; 21 polimorfismos no íntron 16; uma deleção de 60 nucleotídeos (g. 28130_28190 del) no íntron 16; e principalmente uma deleção de 4165 nucleotídeos entre os íntrons 14 e 16 (Tabela 15).

TABELA 15: Polimorfismos, inserção e deleção encontrados nas sequências de DNA dos animais afetados em relação à sequência genômica de referência para o gene *CLCN1* suíno (NC_010460.4).

NUCLEOTÍDEO NOS ANIMAIS MIOTÔNICOS	NUCLEOTÍDEO REFERÊNCIA NC_010460.4	POSIÇÃO A PARTIR DO ATG	ÍNTRON
G	A	22638	14
G	T	22663	14
G	A	22688	14
G	A	22713	14
C	T	22737	14
G	A	22781	14
A	G	22785	14
C	T	22786	14
T	A	22866	14
G	C	22983	14
A	G	22985	14
T	C	23084	14
C	T	23093	14
T	G	23196	14
T	C	23199	14
C	T	23223	14
G	T	23383	14
G	A	23414	14
G	A	23435	14
A	G	23469	14
INS ATCG	-	23616	14
G	A	23635	14
A	T	23655	14
A	C	27827	16
A	T	27829	16
T	A	27830	16
G	C	27831	16
G	A	27832	16
G	C	27833	16
T	C	27834	16
T	A	27835	16
T	C	27836	16
A	G	27838	16
A	G	27930	16
A	G	27933	16
A	G	27935	16
G	T	28113	16
DEL 6413_6473	-	28130	16-17
C	A	28209	16
A	C	28248	16
C	T	28252	16
Y	T	28319	16
M	C	28320	16
A	G	28322	16
A	G	28336	16

A deleção de 4165pb (g. NC_010460.4 del 6912538_6916702), é composta por: 1137 nucleotídeos da extremidade 5' do íntron 14; 214 nucleotídeos referentes ao éxon 15; 245 nucleotídeos referentes ao íntron 15; 134 nucleotídeos referentes ao éxon 16 e 2435 nucleotídeos da extremidade 3' do íntron 16 (Tabela 16)(Figura 17 e 18).

TABELA 16: Composição da deleção verificada nas sequências de DNA dos animais afetados em comparação com a sequência referência do gene *CLCN1* suíno (NC_010460.4).

REGIÃO	Nº DE NUCLEOTÍDEOS (PB)	POSIÇÃO A PARTIR DO ATG
Final do íntron 14	1137	23658 a 24794
Éxon 15	214	24795 a 25008
Íntron 15	245	25009 a 25253
Éxon 16	134	25254 a 25387
Início do íntron 16	2435	25388 a 27822
TOTAL	4165	23658 a 27822



FIGURA 17: Esquema representando a deleção verificada nas sequências de DNA do *CLCN1* dos animais afetados. Os retângulos representam os íntrons 14, 15 e 16 e os éxons 14, 15, 16 e 17 respectivamente. O retângulo vermelho sobreposto representa a região de deleção.

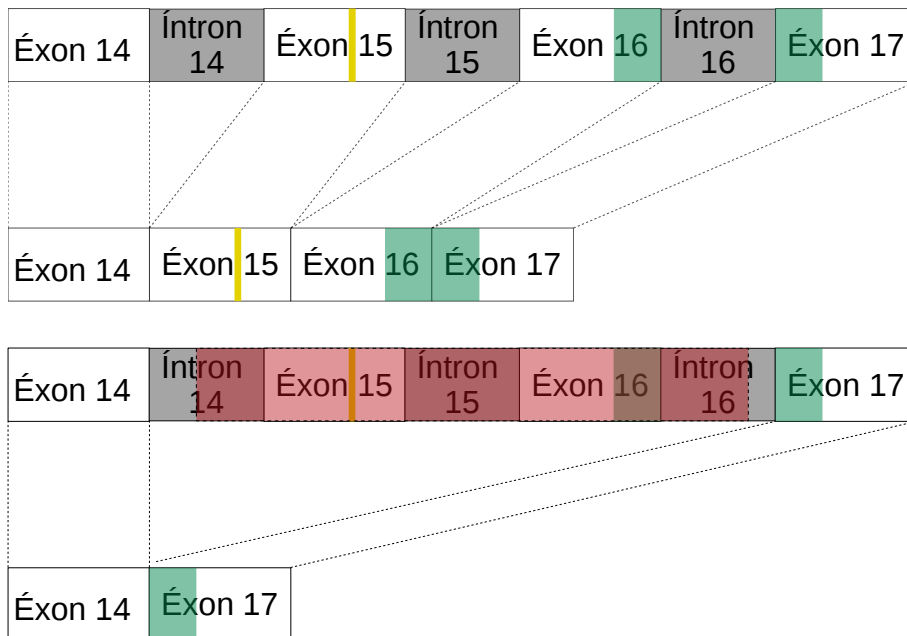


FIGURA 18: Esquema representando a transcrição do *CLCN1*, na região entre o éxon 14 e o éxon 17, de animais *wild type* (**A**) e miotônicos (**B**). Em retângulos estão representados os íntrons e os éxons. em retângulos verdes a região codificante para um dos domínios CBS, em amarelo o resíduo de Tirosina que participa da formação do poro seletivo de Cl⁻, as linhas tracejadas representam o processamento de *splicing*. Note a ausência dos éxons 15 e 16 no transcrito de animais miotônicos, e conseqüentemente a ausência do resíduo de Tirosina e de parte do domínio CBS.

VIII.I) DESENVOLVIMENTO DO TESTE DIAGNÓSTICO

A genotipagem se deu por observação das bandas no gel de agarose 1,5% após eletroforese. Bandas únicas com tamanho de 868pb indicam um resultado de homocigoto *wild type*; bandas duplas com 868pb e 458pb indicam um resultado de heterocigoto; e bandas únicas de 458pb indicam um resultado de homocigoto recessivo (miotônico) (Figura 19).

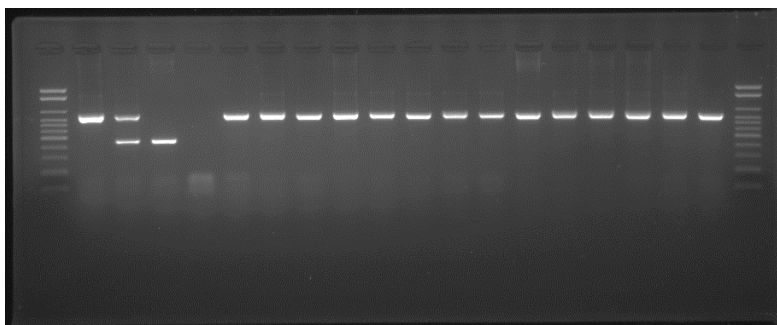


FIGURA 19: Eletroforese em gel de agarose a 1,5% para teste diagnóstico de miotonia hereditária em suínos. Poços 1 e 20: marcador de peso molecular. Poço 2- controle para resultado *wild type*. Poço 3 - controle para resultado heterozigoto. Poço 4 - controle para resultado homozigoto recessivo. Poço 5 -controle negativo da reação. Poços 6 a 19 - probandos com resultado homozigoto *wild types*.

A PCR padronizada possibilitou a genotipagem dos 26 animais experimentais (Tabela 17). Adicionalmente, as 150 amostras de sangue de suínos amostrados por conveniência foram genotipados e classificados como *Wild Type*.

TABELA 17: Resultado do teste diagnóstico (Genótipo).

Animal	Categoria	Fenótipo	Genótipo
A	Fêmea adulta (F0)	Miotônico	del/del
B	Macho adulto (F0)	Miotônico	del/del
C	Macho adulto (F0)	Miotônico	del/del
D	Macho adulto (F0)	Miotônico	del/del
E	Macho adulto (F0)	Miotônico	del/del
F	Fêmea adulta (F1)	Normal	N/del
G	Fêmea adulta (F1)	Normal	N/del
H	Fêmea adulta (F1)	Normal	N/del
I	Fêmea adulta (F1)	Normal	N/del
J	Macho adulto (F1)	Normal	N/del
K	Macho adulto (F1)	Normal	N/del
L	Fêmea Jovem (F2)	Normal	N/del
M	Fêmea Jovem (F2)	Normal	N/del
N	Fêmea Jovem (F2)	Normal	N/del
O	Fêmea Jovem (F2)	Miotônico	del/del
P	Fêmea Jovem (F2)	Miotônico	del/del
Q	Macho jovem (F2)	Normal	N/del
R	Macho jovem (F2)	Normal	N/del
S	Macho jovem (F2)	Normal	N/del
T	Macho jovem (F2)	Normal	N/N
U	Macho jovem (F2)	Miotônico	del/del
V	Macho jovem (F2)	Miotônico	del/del
1	Macho Adulto (C)	Normal	N/N
2	Fêmea Adulta (C)	Normal	N/N
3	Macho Adulto (C)	Normal	N/N
4	Fêmea Adulta (C)	Normal	N/N

N= alelo sem a deleção. Del = alelo com a deleção g. NC_010460.4 del 6912538_6916702.

VIII.J) EXPRESSÃO RELATIVA DOS TRANSCRITOS *CLCN1*.

Após padronização, todas as reações apresentaram eficiência entre 95% e 105%, e apresentaram produtos únicos verificados na curva de dissociação (Figura 20).

Para o produto P8 (localizado no éxon 8) os valores médios de ΔCT foram semelhantes entre *wild types*, heterozigotos e recessivos (afetados) (Tabela 18). Para o produto P15-16 (localizado nos éxons 15 e 16, ausentes nos animais afetados), os valores médios de ΔCT foram semelhantes entre *wild types* e heterozigotos, não havendo amplificação nos animais afetados (Tabela 19).

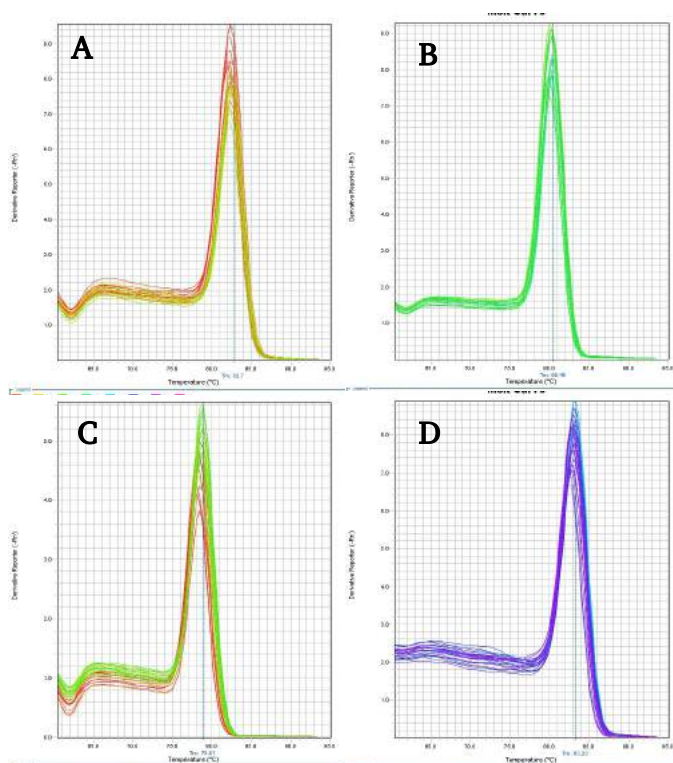


FIGURA 20: Curva de dissociação das reações para os produtos A- P8, B- P15-16, C- P14/17 e D- Bact. A temperatura é exibida no eixo das abcissas e a fluorescência (*derivative reporter*, -Rn) é exibida no eixo das ordenadas.

TABELA 18: Média e desvio padrão para os valores de CT e Δ CT referentes ao produto P8 considerando B actina como *housekeeping*.

Produto P8								
Animal	Genótipo	CT médio	CT SD	CT B actin	CT B actin SD	Δ CT	Δ CT mean	Δ CT SD
1	<i>wild type</i>	23,169	0,085	14,209	0,243	8,96		
2	<i>wild type</i>	22,962	0,184	13,844	0,048	9,118	9,526	0,847
3	<i>wild type</i>	24,47	0,154	13,97	0,109	10,5		
H	Heterozig	23,871	0,238	14,343	0,179	9,528		
K	Heterozig	24,274	0,318	13,9	0,151	10,374	9,677	0,635
Q	Heterozig	23,42	0,009	14,29	0,093	9,13		
O	Recessivo	24,588	0,003	15,985	0,297	8,603		
P	Recessivo	23,481	0,079	14,589	0,144	8,892	9,318	0,999
V	Recessivo	24,849	0,258	14,388	0,178	10,461		

CT SD- desvio padrão entre os valores de CT obtidos na triplicata da amostra para o produto P8. CT B actin SD- desvio padrão entre os valores de CT obtidos na triplicata da amostra para o produto B actina. Δ CT SD desvio padrão verificado entre os valores de Δ CT de cada categoria.

TABELA 19: Média e desvio padrão para os valores de CT e Δ CT referentes ao produto P15-16 considerando B actina como *housekeeping*.

Produto P15-16								
Animal	Genótipo	CT médio	CT SD	CT B actin	CT B actin SD	Δ CT	Δ CT mean	Δ CT SD
1	<i>wild type</i>	22,064	0,239	14,209	0,243	7,855		
2	<i>wild type</i>	22,125	0,284	13,844	0,048	8,281	8,455	0,703
3	<i>wild type</i>	23,199	0,203	13,97	0,109	9,229		
H	Heterozig	23,72	0,053	14,343	0,179	9,377		
K	Heterozig	22,935	0,104	13,9	0,151	9,035	8,93	0,506
Q	Heterozig	22,67	0,064	14,29	0,093	8,38		
O	Recessivo	-	-	15,985	0,297	-		
P	Recessivo	-	-	14,589	0,144	-	-	-
V	Recessivo	-	-	14,388	0,178	-		

- não houve amplificação. CT SD- desvio padrão entre os valores de CT obtidos na triplicata da amostra para o produto P15-16. CT B actin SD- desvio padrão entre os valores de CT obtidos na triplicata da amostra para o produto B actina. Δ CT SD desvio padrão verificado entre os valores de Δ CT de cada categoria.

Considerando os valores de $2^{-\Delta\Delta CT}$, para o produto P8, a expressão relativa foi maior para os recessivos afetados, seguidos por *wild types* e heterozigotos. Recessivos afetados expressaram em média 1,15 e 1,28 vezes mais expresso o produto P8, em relação aos animais *wild types* e heterozigotos (Tabela 20) (Figura 21).

TABELA 20: Valores de $2^{-\Delta\Delta CT}$ para os produtos P8 e P15-16, comparados entre os animais *wild types*, heterozigotos e homozigotos recessivos.

	WTxHT=1	WTxHR= 1	HTxWT=1	HTxHR=1	HRxWT=1	HRxHT=1
P8	1,110	0,865	0,900	0,779	1,155	1,282
P15-16	1,389	-	0,719	-	-	-

WT= *Wild Type*. HT= Heterozigoto. HR=Homozigoto recessivo. - não houve expressão verificada nos homozigotos recessivos.

Em relação ao produto P14/17 (produto com oligonucleotídeo iniciador *reverse* localizado na junção entre éxon 14/17), houve diferença nos valores de ΔCT entre os as categorias animais *wild type*, heterozigotos e homozigotos recessivos (Tabela 21).

TABELA 21: Média e desvio padrão para os valores de CT e ΔCT referentes ao produto P14/17 considerando B actina como *housekeeping*.

Produto P14/17								
Animal	Genótipo	CT médio	CT SD	CT B actin	CT B actin SD	ΔCT	ΔCT média	ΔCT SD
1	<i>wild type</i>	30,036	0,161	13,916	0,108	16,120		
2	<i>wild type</i>	29,774	0,351	14,002	0,121	15,772	15,814	0,286
3	<i>wild type</i>	30,500	0,261	14,948	0,055	15,552		
H	Heterozig	27,497	0,172	14,940	0,148	12,557		
K	Heterozig	27,341	0,029	14,923	0,051	12,418	12,578	0,171
Q	Heterozig	27,918	0,061	15,159	0,104	12,759		
O	Recessivo	27,415	0,163	15,630	0,08	11,785		
P	Recessivo	26,189	0,04	14,339	0,111	11,850	11,838	0,048
V	Recessivo	27,074	0,263	15,195	0,049	11,879		

CT SD- desvio padrão entre os valores de CT obtidos na triplicata. CT B actin SD- desvio padrão entre os valores de CT obtidos na triplicata da amostra para o produto B actina. ΔCT SD desvio padrão verificado entre os valores de ΔCT de cada categoria.

Considerando os valores de Valores de $2^{-\Delta\Delta CT}$, para o produto P14/17 a expressão relativa foi maior para os recessivos afetados, seguidos por heterozigotos e *wild types* (Tabela 20). Os animais homozigotos recessivos afetados expressaram em média 9,42 e 15,73 vezes mais o produto P14/17 em relação aos animais heterozigotos e homozigotos *wild types*, respectivamente (Figura 21).

TABELA 22: Valores de $2^{-\Delta\Delta CT}$ para o produto P14/17, comparados entre os animais *wild types*, heterozigotos e homozigotos recessivos.

	WTxHT=1	WTxHR= 1	HTxWT=1	HTxHR=1	HRxWT=1	HRxHT=1
P14/17	0,10	0,063	9,42	0,59	15,73	1,67

WT= *Wild Type*. HT= Heterozigoto. HR=Homozigoto recessivo. - não houve expressão verificada nos homozigotos recessivos.

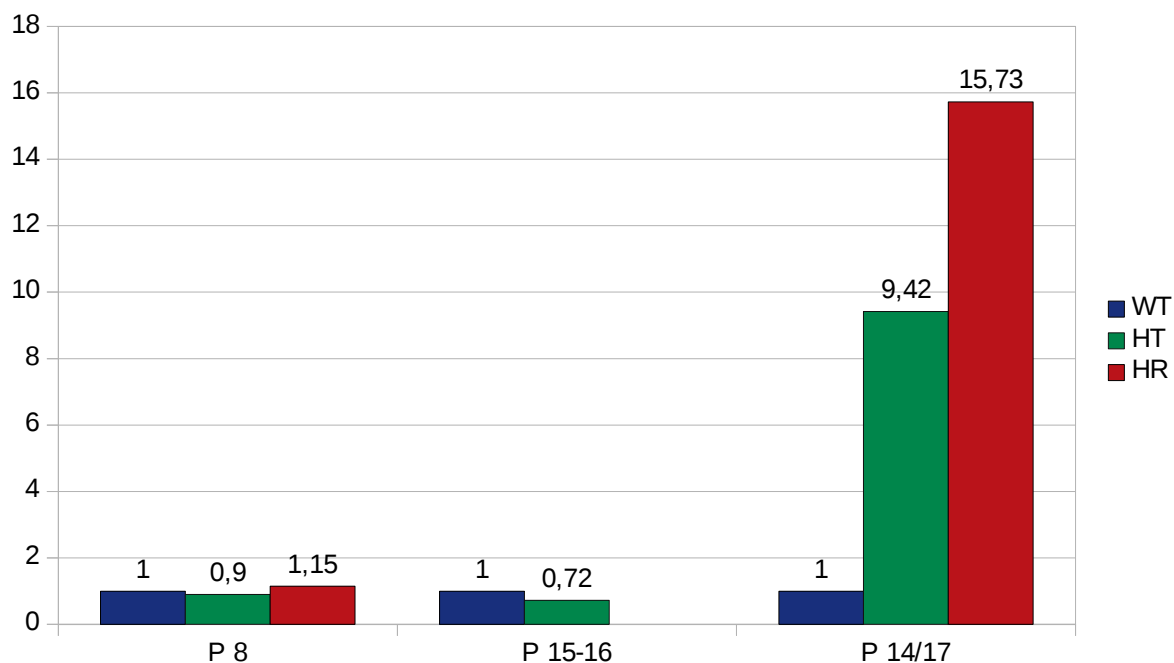


FIGURA 21: Gráfico de barras demonstrando os valores de expressão relativa para os produtos P8, P15-16 e P14/17 utilizando a metodologia $2^{-\Delta\Delta CT}$. WT em azul para animais *wild type*. HT em verde para os animais heterozigotos. HR em vermelho para os animais homozigoto recessivos (afetados). Note a ausência de valor para o produto P15-16 referente aos animais afetados. Note que a semelhança entre os valores dos produtos P8 e P15-16 para os grupos avaliados. Note a diferença entre os valores para o produto P14/17.

ANÁLISE DA ESTRUTURA PROTEÍCA

VIII.K) ESTRUTURAS PRIMÁRIA E SECUNDÁRIA

As sequências proteicas preditas para os animais *wild type* e recessivo miotônico foram alinhadas com as sequências referências de aminoácidos da proteína *CLC1* suína, isoforma X1 (XP_020934220.1) e isoforma X2 (XP_020934221.1) (Figura 15). As sequências dos *wild types* e X1 são idênticas. Diferentemente, a sequência dos recessivos miotônicos apresentam duas substituições de aminoácidos, consistindo de uma substituição de Metionina por Valina e uma substituição de Alanina por Valina. Além disso, na sequência dos recessivos afetados, estão ausentes 116 aminoácidos, referentes aos códons dos éxons 15 e 16, quando comparados as sequências dos animais *wild types* e/ou isoforma X1 (XP_020934220.1). Entretanto esses 116 aminoácidos não são considerados na sequência referência isoforma X2 (XP_020934221.1) (Tabela 23) (Figura 22).

TABELA 23: Diferenças observadas na sequência inferida da proteína *CLC1* dos animais recessivos miotônicos, comparadas as sequências: inferida dos animais *wild types*, sequência referência isoforma X1 e referência isoforma X2.

Miotônico	<i>Wild type</i>	Ref X1 XP_020934220.1	Ref X2 XP_020934221.1	Posição desde a Met inicial
<u>Val</u>	Met	Met	Met	76
<u>Val</u>	Ala	Ala	Ala	920
Deleção 116 aminoácidos	+	+	Ausentes	528_643

+ esses 116 aminoácidos estão presentes nessas sequências.

Considerando a topologia do cotransportador *CLC* de eucarioto-*CmCLC*, essa ausência de 116 aminoácidos, compreende desde aproximadamente metade da α -hélice O até a metade do primeiro domínio CBS (Figura 23).

```

1. X1-XP_02093422... 1 10 20 30 40
2. X2-XP_02093422... M E P S E S Q R R G R E Q S W W G S A P Q Y Q Y M P F E H C T S Y G L P S E N G G L
3. CLC1 Wild type C... M E P S E S Q R R G R E Q S W W G S A P Q Y Q Y M P F E H C T S Y G L P S E N G G L
4. CLC1 Myotonic C... M E P S E S Q R R G R E Q S W W G S A P Q Y Q Y M P F E H C T S Y G L P S E N G G L

1. X1-XP_02093422... 50 60 70 80
2. X2-XP_02093422... Q H R L R R D A G P R P S A H P T Q I Y G H H K E Q F S D K E P D M G M P E K M G S
3. CLC1 Wild type C... Q H R L R R D A G P R P S A H P T Q I Y G H H K E Q F S D K E P D M G M P E K M G S
4. CLC1 Myotonic C... Q H R L R R D A G P R P S A H P T Q I Y G H H K E Q F S D K E P D M G M P E K M G S

1. X1-XP_02093422... 90 100 110 120
2. X2-XP_02093422... S S S V D S K D E D R Y S K C Q G C I H R M G L V V R R K L G E D W I F L V L L G L
3. CLC1 Wild type C... S S S V D S K D E D R Y S K C Q G C I H R M G L V V R R K L G E D W I F L V L L G L
4. CLC1 Myotonic C... S S S V D S K D E D R Y S K C Q G C I H R M G L V V R R K L G E D W I F L V L L G L

1. X1-XP_02093422... 130 140 150 160
2. X2-XP_02093422... L M A L V S W C M D Y V S A K S L Q A Y K W T Y Y Q M Q P N L P L Q F L V W V T F P
3. CLC1 Wild type C... L M A L V S W C M D Y V S A K S L Q A Y K W T Y Y Q M Q P N L P L Q F L V W V T F P
4. CLC1 Myotonic C... L M A L V S W C M D Y V S A K S L Q A Y K W T Y Y Q M Q P N L P L Q F L V W V T F P

1. X1-XP_02093422... 170 180 190 200 210
2. X2-XP_02093422... L V L I L F S A L F C H L I S P Q A V G S G I P E M K T I L R G V V L K E Y L T L K
3. CLC1 Wild type C... L V L I L F S A L F C H L I S P Q A V G S G I P E M K T I L R G V V L K E Y L T L K
4. CLC1 Myotonic C... L V L I L F S A L F C H L I S P Q A V G S G I P E M K T I L R G V V L K E Y L T L K

1. X1-XP_02093422... 220 230 240 250
2. X2-XP_02093422... A F V A K V V A L T A G L G S G I P V G K E G P F V H I A S I C A A V L S K F M S V
3. CLC1 Wild type C... A F V A K V V A L T A G L G S G I P V G K E G P F V H I A S I C A A V L S K F M S V
4. CLC1 Myotonic C... A F V A K V V A L T A G L G S G I P V G K E G P F V H I A S I C A A V L S K F M S V

1. X1-XP_02093422... 260 270 280 290
2. X2-XP_02093422... F C G V Y E Q P Y Y Y T D M L T V G C A V G V G C C F G T P L G G V L F S I E V T S
3. CLC1 Wild type C... F C G V Y E Q P Y Y Y T D M L T V G C A V G V G C C F G T P L G G V L F S I E V T S
4. CLC1 Myotonic C... F C G V Y E Q P Y Y Y T D M L T V G C A V G V G C C F G T P L G G V L F S I E V T S

1. X1-XP_02093422... 300 310 320 330
2. X2-XP_02093422... T Y F A V R N Y W R G F F A A T F S A F V F R V L A V W N K D A V T I T A L F R T N
3. CLC1 Wild type C... T Y F A V R N Y W R G F F A A T F S A F V F R V L A V W N K D A V T I T A L F R T N
4. CLC1 Myotonic C... T Y F A V R N Y W R G F F A A T F S A F V F R V L A V W N K D A V T I T A L F R T N

1. X1-XP_02093422... 340 350 360 370
2. X2-XP_02093422... F R M D F P F D L Q E L P A F A V I G I C C G F L G A V F V Y L H R Q V M L G V R K
3. CLC1 Wild type C... F R M D F P F D L Q E L P A F A V I G I C C G F L G A V F V Y L H R Q V M L G V R K
4. CLC1 Myotonic C... F R M D F P F D L Q E L P A F A V I G I C C G F L G A V F V Y L H R Q V M L G V R K

1. X1-XP_02093422... 380 390 400 410 420
2. X2-XP_02093422... H K G L S Q F L A K H R L L Y P G I V T F V I A S F T F P P G I G Q F M A G E L M P
3. CLC1 Wild type C... H K G L S Q F L A K H R L L Y P G I V T F V I A S F T F P P G I G Q F M A G E L M P
4. CLC1 Myotonic C... H K G L S Q F L A K H R L L Y P G I V T F V I A S F T F P P G I G Q F M A G E L M P

1. X1-XP_02093422... 430 440 450 460
2. X2-XP_02093422... R E A I S T L F D N H T W V K H V G D P E S L G R S A V W I H P K V N V V V I L L
3. CLC1 Wild type C... R E A I S T L F D N H T W V K H V G D P E S L G R S A V W I H P K V N V V V I L L
4. CLC1 Myotonic C... R E A I S T L F D N H T W V K H V G D P E S L G R S A V W I H P K V N V V V I L L

1. X1-XP_02093422... 470 480 490 500
2. X2-XP_02093422... F F I M K F W M S I V A T T M P I P C G G F M P V F V L G A A F G R L V G E I M A M
3. CLC1 Wild type C... F F I M K F W M S I V A T T M P I P C G G F M P V F V L G A A F G R L V G E I M A M
4. CLC1 Myotonic C... F F I M K F W M S I V A T T M P I P C G G F M P V F V L G A A F G R L V G E I M A M

1. X1-XP_02093422... 510 520 530 540
2. X2-XP_02093422... L F P D G I L F D D I I Y K I L P G G Y A V I G A A A L T G A V S H T V S T A V I C
3. CLC1 Wild type C... L F P D G I L F D D I I Y K I L P G G Y A V I G A A A L T G A V S H T V S T A V I C
4. CLC1 Myotonic C... L F P D G I L F D D I I Y K I L P G G Y A V I -----

1. X1-XP_02093422... 550 560 570 580
2. X2-XP_02093422... F E L T G Q I A H I L P M M V A V I L A N M V A Q S L Q P S L Y D S I I Q V K K L P
3. CLC1 Wild type C... F E L T G Q I A H I L P M M V A V I L A N M V A Q S L Q P S L Y D S I I Q V K K L P
4. CLC1 Myotonic C... -----

```

```

590          600          610          620          630
1. X1- XP_02093422... Y L P D L G W N Q L S K F T I F V E D I M V R D V K F V S A S C T Y G E L Q N L L Q
2. X2- XP_02093422... -----
3. CLC1 Wild type C... Y L P D L G W N Q L S K F T I F V E D I M V R D V K F V S A S C T Y G E L Q N L L Q
4. CLC1 Myotonic C... -----

640          650          660          670
1. X1- XP_02093422... T T T L K T L P L V D S K D S M I L L G S V E R S E L Q S L L Q R H L C P E R R L R
2. X2- XP_02093422... -----
3. CLC1 Wild type C... T T T L K T L P L V D S K D S M I L L G S V E R S E L Q S L L Q R H L C P E R R L R
4. CLC1 Myotonic C... -----

680          690          700          710
1. X1- XP_02093422... A A Q D M A R K L S E L P F D G K A G V G R R G V W P Q G R P E S F A F V D E D E D
2. X2- XP_02093422... A A Q D M A R K L S E L P F D G K A G V G R R G V W P Q G R P E S F A F V D E D E D
3. CLC1 Wild type C... A A Q D M A R K L S E L P F D G K A G V G R R G V W P Q G R P E S F A F V D E D E D
4. CLC1 Myotonic C... A A Q D M A R K L S E L P F D G K A G V G R R G V W P Q G R P E S F A F V D E D E D

720          730          740          750
1. X1- XP_02093422... E D V C G K P E P S P L T P P L P F S T A P L H P E E P N G P L P S P K Q Q P E A P
2. X2- XP_02093422... E D V C G K P E P S P L T P P L P F S T A P L H P E E P N G P L P S P K Q Q P E A P
3. CLC1 Wild type C... E D V C G K P E P S P L T P P L P F S T A P L H P E E P N G P L P S P K Q Q P E A P
4. CLC1 Myotonic C... E D V C G K P E P S P L T P P L P F S T A P L H P E E P N G P L P S P K Q Q P E A P

760          770          780          790
1. X1- XP_02093422... E P A G Q R P S V F R T L L R C L L G R A R P T K K K P T Q E P V D L V D N M S P E
2. X2- XP_02093422... E P A G Q R P S V F R T L L R C L L G R A R P T K K K P T Q E P V D L V D N M S P E
3. CLC1 Wild type C... E P A G Q R P S V F R T L L R C L L G R A R P T K K K P T Q E P V D L V D N M S P E
4. CLC1 Myotonic C... E P A G Q R P S V F R T L L R C L L G R A R P T K K K P T Q E P V D L V D N M S P E

800          810          820          830          840
1. X1- XP_02093422... D I E A W E R E Q L S Q P V C F D C C C I D Q S P F Q L V E Q T S L H K T H T L F S
2. X2- XP_02093422... D I E A W E R E Q L S Q P V C F D C C C I D Q S P F Q L V E Q T S L H K T H T L F S
3. CLC1 Wild type C... D I E A W E R E Q L S Q P V C F D C C C I D Q S P F Q L V E Q T S L H K T H T L F S
4. CLC1 Myotonic C... D I E A W E R E Q L S Q P V C F D C C C I D Q S P F Q L V E Q T S L H K T H T L F S

850          860          870          880
1. X1- XP_02093422... L L G L H L A Y V T S M G K L R G V L A L E E L Q K A I E G H T K S G V Q L R P P L
2. X2- XP_02093422... L L G L H L A Y V T S M G K L R G V L A L E E L Q K A I E G H T K S G V Q L R P P L
3. CLC1 Wild type C... L L G L H L A Y V T S M G K L R G V L A L E E L Q K A I E G H T K S G V Q L R P P L
4. CLC1 Myotonic C... L L G L H L A Y V T S M G K L R G V L A L E E L Q K A I E G H T K S G V Q L R P P L

890          900          910          920
1. X1- XP_02093422... A S F R S T T S T R K T P G G P L P P A E A W T M P D D G T G A T S A G D A A P D S
2. X2- XP_02093422... A S F R S T T S T R K T P G G P L P P A E A W T M P D D G T G A T S A G D A A P D S
3. CLC1 Wild type C... A S F R S T T S T R K T P G G P L P P A E A W T M P D D G T G A T S A G D A A P D S
4. CLC1 Myotonic C... A S F R S T T S T R K T P G G P L P P A E A W T M P D D G T G A T S A G D V A P D S

930          940          950          960
1. X1- XP_02093422... P E T P V P S P S P E P P L S R A P A K A E S E L E E L E L A E S P G P E E E L A D
2. X2- XP_02093422... P E T P V P S P S P E P P L S R A P A K A E S E L E E L E L A E S P G P E E E L A D
3. CLC1 Wild type C... P E T P V P S P S P E P P L S R A P A K A E S E L E E L E L A E S P G P E E E L A D
4. CLC1 Myotonic C... P E T P V P S P S P E P P L S R A P A K A E S E L E E L E L A E S P G P E E E L A D

970          980          986
1. X1- XP_02093422... I L Q G P S L R L T D E E D E D E L I L
2. X2- XP_02093422... I L Q G P S L R L T D E E D E D E L I L
3. CLC1 Wild type C... I L Q G P S L R L T D E E D E D E L I L
4. CLC1 Myotonic C... I L Q G P S L R L T D E E D E D E L I L

```

FIGURA 22: Alinhamento entre as sequências preditas da proteína *CLC1* dos animais recessivos miotônicos (*CLC1 Myotonic Consensus*) e *wild types* (*Wild type Consensus*) comparadas as sequências referência isoforma X1 (XP_020934220.1) e referência isoforma X2 (XP_020934221.1). Note os dois resíduos de Valina na sequência dos animais recessivos destacados em azul. Os █ representam a deleção de 116 aminoácidos na sequência dos animais recessivos e, a ausência desses resíduos na sequência referência X2.

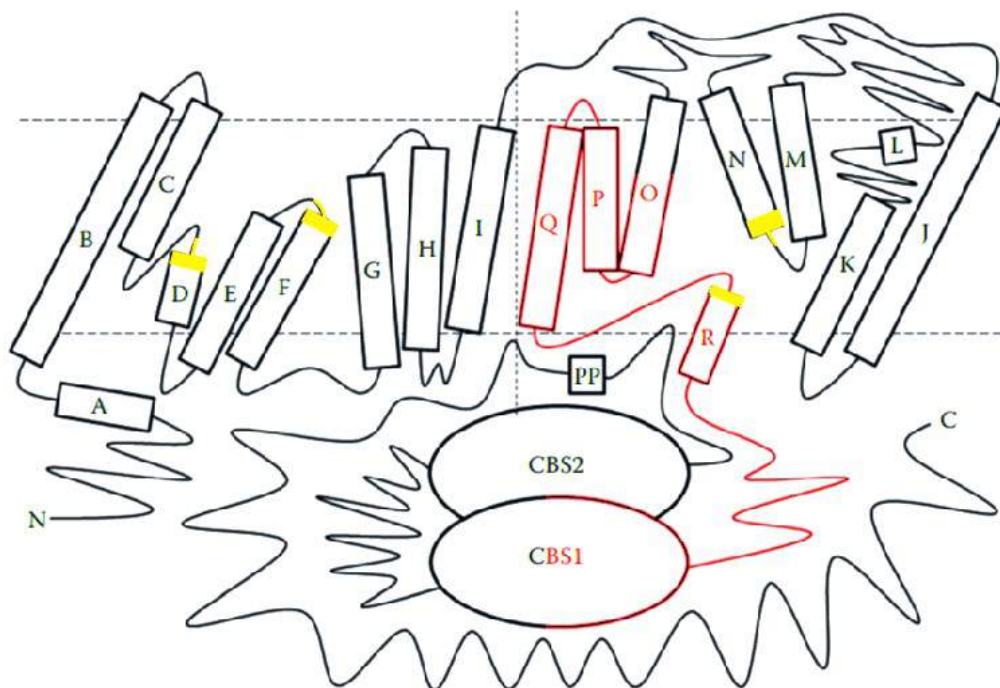


FIGURA 23: Representação esquemática bidimensional de um monômero/subunidade do cotransportador *CLC* de eucarioto-*CmCLC* (Feng et al. 2010). As linhas tracejadas horizontais representam a topologia da membrana plasmática. Os cilindros representam α Hélices, que necessariamente não atravessam a membrana plasmática, embora estejam localizadas na membrana, com exceção da hélice A, que é citoplasmática. As marcações amarelas representam as regiões que participam do poro condutor seletivo para o íon cloreto pertencentes às hélices α -D, α -F, α -N e α -R. A longa cadeia C-Terminal está representada com seus dois domínios CBS. A linha tracejada vertical representa as metades semelhantes da mesma subunidade. A região destacada em vermelho representa os 116 aminoácidos codificados pelos nucleotídeos ausentes nas sequências dos animais afetados.

Foram alinhadas as sequências de aminoácidos referências da proteína *CLC1* de 15 mamíferos diferentes, incluindo o suíno e o humano. Os números de acesso e a respectiva espécie animal estão listados na tabela 10.

O alinhamento (Figura 24) resultante possui 73,6% de identidade absoluta e 89,1% de identidade relativa. Considerando somente a região de 116pb relativas à deleção observada nos animais miotônicos, o alinhamento das 12 sequências obteve 92,2% de identidade absoluta e 97,5% de identidade relativa. Pode-se verificar também os dois resíduos que são modificados, decorrentes dos polimorfismos dos suínos afetados, alinhadas com essas espécies.

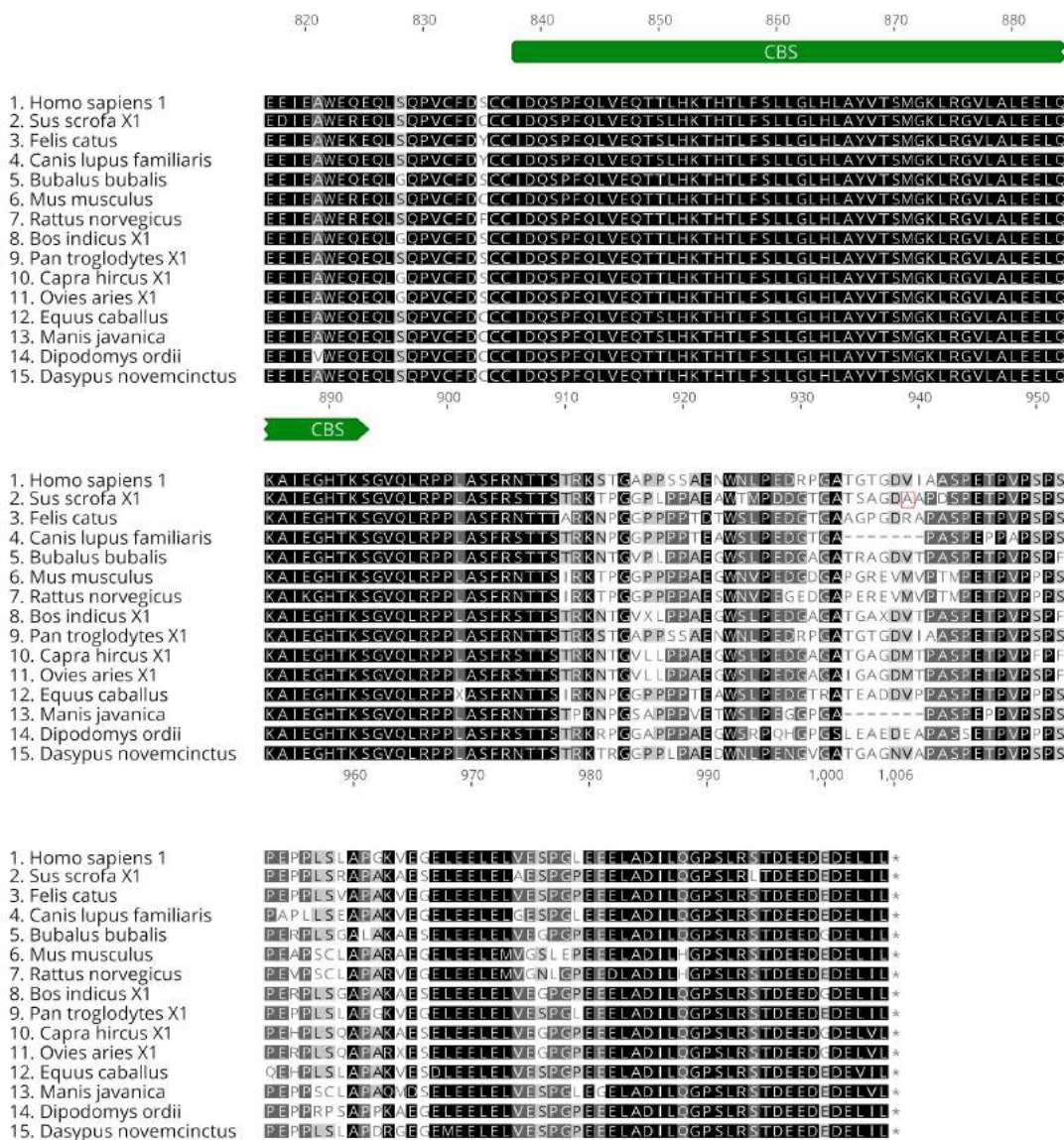


FIGURA 24: Alinhamento das sequências referências de aminoácidos da proteína CLC1 de 15 espécies diferentes de mamíferos. As sequências estão identificadas conforme a tabela 22. Ressaltado em branco, cinza e preto estão os resíduos diferentes, similares e idênticos, respectivamente. Ressaltados em quadrados vermelhos estão as duas mudanças de resíduos verificadas nos animais miotônicos, p.M76V e p.A920V respectivamente. Note que são resíduos pouco conservados considerando esse alinhamento. Assinalado em barras azuis estão os aminoácidos que participam do sítio filtro seletivo ao íon cloreto. Ressaltado em barras verdes estão os aminoácidos que formam os dois domínios CBS. Ressaltados em barra vermelha região da deleção. A deleção engloba um sítio de filtro seletivo - Y na posição 578 e também, os 35 resíduos iniciais dos 60 resíduos que formam o primeiro domínio CBS.

VIII.L) ESTRUTURA TERCIÁRIA

Utilizando o programa Modeller® foram obtidas 5 estruturas preditas para cada modelo adotado, portanto 15 estruturas foram geradas. Os valores de qualidade estão listados na Tabela 24.

TABELA 24: Relação das estruturas obtidas por homologia com os modelos 5TQQ, 3ORG e 1KPL, e respectivos valores de qualidade para o programa Modeller®.

ID	Modelo	Identi			GA341 score	Z-score ProSA- web
		d (%)	molpdf	DOPE score		
1	5TQQ	42,61	5970,34424	-77118,51563	1	-4,66
2	5TQQ	42,61	6150,73242	-77910,76563	1	-4,31
3	5TQQ	42,61	6113,84424	-76591,82031	1	-4,73
4	5TQQ	42,61	6253,56055	-77109,83594	1	-4,57
5	5TQQ	42,61	6035,15967	-77379,22656	1	-4,88
6	3ORG	37,44	5185,30957	-76919,43750	1	-4,43
7	3ORG	37,44	5241,60205	-75198,86719	1	-3,79
8	3ORG	37,44	4919,15039	-75081,53125	1	-4,02
9	3ORG	37,44	5056,00586	-75954,14063	1	-4,05
10	3ORG	37,44	4678,79150	-76191,89063	1	-4,81
11	1KPL	31,37	3838,46704	-62181,30469	0,9999	-2,59
12	1KPL	31,37	5136,35742	-61110,01172	0,9720	-1,78
13	1KPL	31,37	3585,91675	-61868,75000	0,9999	-0,33
14	1KPL	31,37	4236,24512	-62066,84766	0,9621	-2,47
15	1KPL	31,37	3555,78955	-61720,72266	0,9999	-2,14

Utilizando o software Swiss-Model foram geradas 2 estruturas preditas para cada modelo adotado, portanto 6 estruturas foram geradas. Os valores de qualidade avaliados estão dispostos na Tabela 25

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®.

ID	Modelo	Identidad e (%)	CMQE	QMEAN	Z-score
					ProSA- web
16 (CLC _{WT})	5TQQ	43,49	0,74	-2,89	-6,66
17	5TQQ	43,41	0,73	-3,79	-6,57

18	3ORG	30,66	0,60	-4,75	-6,4
19	3ORG	33,90	0,51	-6,11	-5,47
20	1KPL	23,72	0,45	-6,06	-4,91
21	1KPL	22,37	0,37	-7,44	-3,01

Considerando os valores de qualidade e o Z-score de -8,82 para o modelo 5TQQ utilizado, a melhor estrutura gerada foi a estrutura 16 (CLC_WT), após otimização, a estrutura final foi sobreposta ao modelo 5TQQ (Figura 25). O alinhamento entre a sequência de aminoácidos (referentes à sequência *consensus* do RNAm dos suínos *wild types*) utilizados para modelar a estrutura 16, e a sequência de aminoácidos do modelo 5TQQ (CLCK bovino) obteve 43,49% de identidade absoluta (Figura 26).

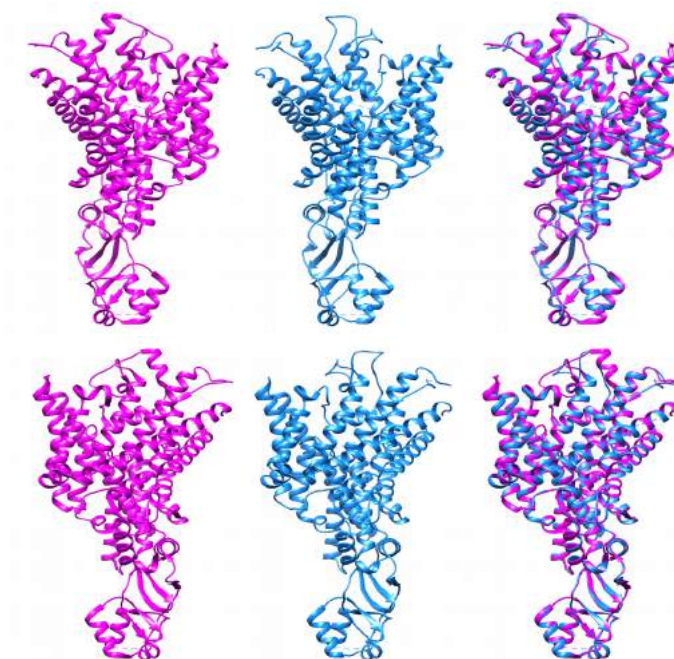


FIGURA 25: Imagens das estruturas de uma subunidade do *CLC1*, 5TQQ (magenta) e 16 (ciano). A cada sequência de 3 imagens (cada linha) cada estrutura é rotacionada em 180°. Note alta semelhança entre o modelo e a estrutura 16 gerada, principalmente quando sobrepostas.

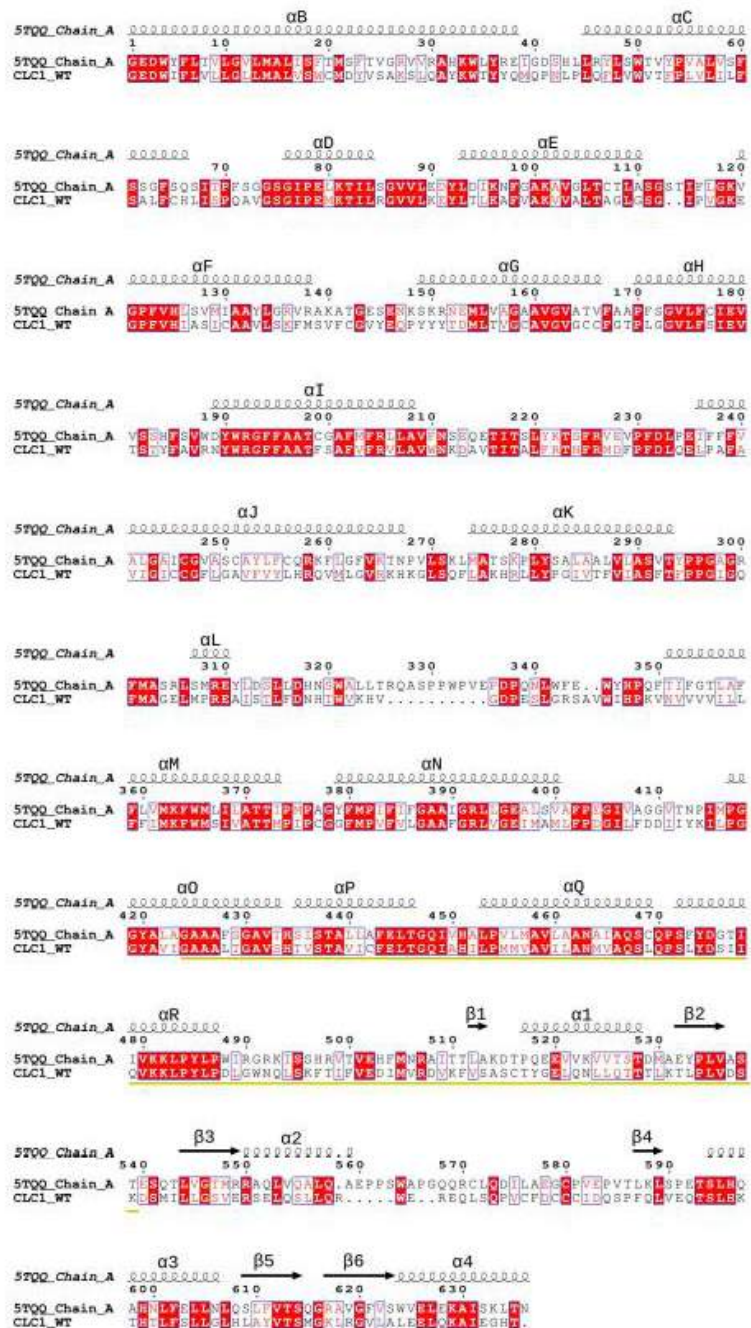


FIGURA 26: Alinhamento entre a sequência de aminoácidos referente à sequência *consensus* de RNAm dos suínos *wild type* sequenciados e a sequência de aminoácidos do modelo 5TQQ (*CLCK* bovino). O programa ESPrript foi utilizado para exibir o alinhamento (ATKINSON; SWIFT; LEQUIRE, 1981). A estrutura secundária está anotada acima do alinhamento, as α -hélices estão nomeadas de A-R conforme proposto por Dutzler *et al.* 2002, os resíduos conservados estão marcados em vermelho, os 116 aminoácidos referentes à deleção estão sublinhados em amarelo.

Utilizando a mesma abordagem de desenho por homologia, não foi possível o desenvolvimento de uma estrutura representativa para a sequência da proteína *CLC1* de animais miotônicos., pois as várias estruturas geradas não foram satisfatórias para valores de qualidade mínimos. Entretanto considerando a estrutura 16, determinada no presente estudo, a deleção g. NC_010460.4 del 6912538_6916702, corresponde a uma região de 116 aminoácidos, que se estende desde aproximadamente metade da α -hélice O até metade do primeiro domínio CBS (Figura 27).

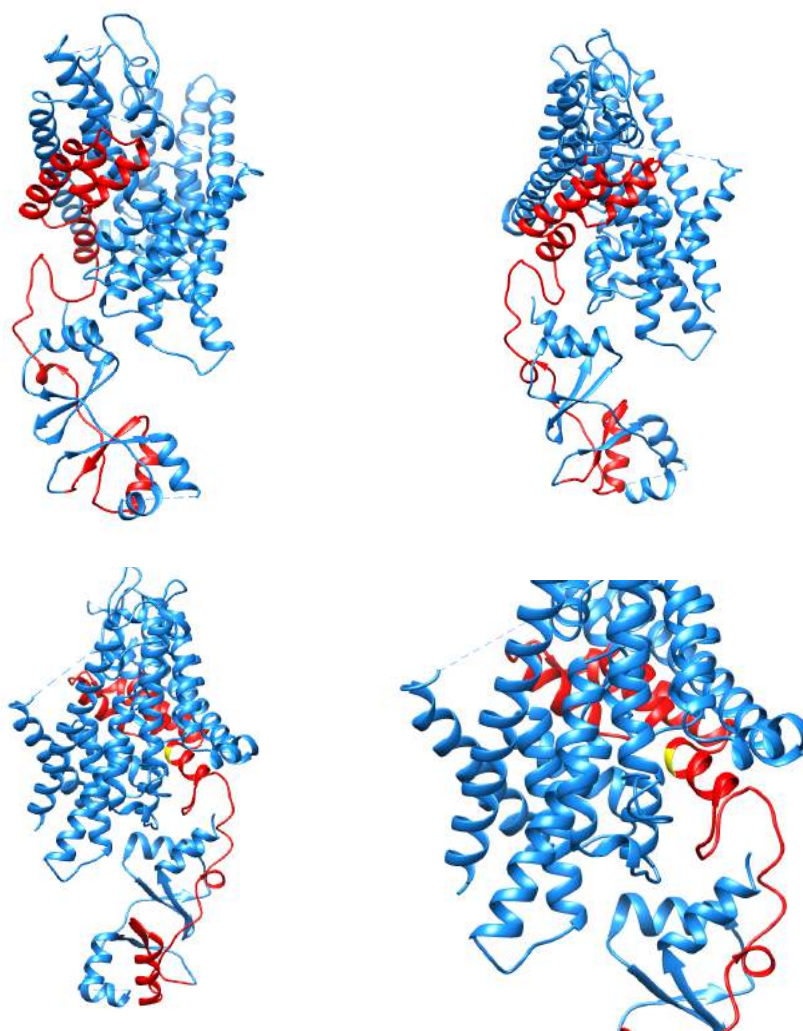


FIGURA 27: Estrutura 16, obtida por modelagem a partir da sequência obtida dos animais *wild type*. Os 116 aminoácidos referentes aos nucleotídeos ausentes nos animais miotônicos estão representados em vermelho. O resíduo de Tirosina que participa do poro seletor para o íon Cl^- está representado em amarelo.

Discussão

IX. DISCUSSÃO

A anamnese e obtenção do histórico familiar dos suínos miotônicos foi determinante para caracterizar uma enfermidade muscular hereditária com padrão de herança autossômico recessivo (BAROHN; DIMACHKIE; JACKSON, 2014a). Nessa condição, a enfermidade é verificada na prole de indivíduos não afetados, e a prole afetada inclui indivíduos de ambos sexos, esses dois aspectos ficam evidentes com a montagem e análise do heredograma (GRIFFITHS et al., 2016). Além disso, a análise do heredograma permite apontar o provável ancestral comum, disseminador da deleção causadora da miotonia hereditária nesses animais, o animal número 18.

Todos os suínos acometidos apresentaram anormalidades relacionadas somente ao sistema muscular, os sinais clínicos verificados nos suínos acometidos foram semelhantes às descrições clínicas existentes de miotonia congênita em humanos (GEORGE et al., 1993; KOCH et al., 1992a; STEINMEYER et al., 1991), cabras (BECK; FAHLKE; GEORGE JR., 1996), cães (FINNIGAN et al., 2007; RHODES et al., 1999), cavalos (WIJNBERG et al., 2012a) e em búfalos (BORGES et al., 2013), principalmente em relação a hipertrofia e rigidez musculares, presença de *scare response* seguida por decúbito. Entretanto hipertrofia lingual e outras alterações bucais conforme descrito em gatos (GANDOLFI et al., 2014) não foram verificadas nos suínos afetados. Em decorrência do comportamento inerente da espécie suína, as frequentes vocalizações verificadas durante a ocorrência de *startle response* e durante a intensa rigidez muscular, não podem ser inferidas como um indicativo de dor. Além disso, nenhuma alteração adicional no comportamento, indicativa de dor, foi verificada portanto a presença ou ausência de dor não pode ser determinada

A ausência de sinais clínicos como fraqueza progressiva e distrofia muscular, corroboraram com um tipo de miotonia não distrófica. A presença do fenômeno *warm-up*, presente em todos os suínos acometidos, direcionou a suspeita clínica para uma canalopatia de canal de cloro muscular (BAROHN; DIMACHKIE; JACKSON, 2014a). Assim

como observado em gatos (GANDOLFI et al., 2014), cabras (BRYANT, 1969) e humanos (BRUGNONI et al., 1999; BURGUNDER et al., 2008; PORTARO et al., 2015), o exame de percussão muscular foi eficiente em gerar a miotonia, os animais miotônicos apresentavam miotonia percussiva com a formação de *dimples* (BORGES et al., 2013).

Dentre os afetados, três animais adultos que apresentavam a forma intensa da miotonia herediária, vieram a óbito decorrente à ocorrência de crises de rigidez muscular nos piquetes sem abrigo do sol. Provavelmente o calor intenso associado com a rigidez muscular intensa contribuíram para a dificuldade respiratória e morte. Sabe-se que a miotonia herediária em carácter recessivo é mais grave que em carácter dominante (DUFFIELD et al., 2003; KOCH et al., 1992a; PORTARO et al., 2015), porém, assim como verificado em búfalos (BORGES et al., 2013) e gatos (GANDOLFI et al., 2014), animais acometidos pelo mesmo defeito genético apresentaram variação fenotípica. As alterações funcionais no *CLC1* decorrentes de defeitos no *CLCN1* são variáveis, pois estão relacionadas com a implicância fisiológica de cada defeito considerado (MATTHEWS et al., 2010; PORTARO et al., 2015). Essa característica da miotonia decorrente de canalopatia do *CLC1* é constantemente descrita em humanos. Algumas abordagens têm buscado relacionar o fenótipo resultante com o tipo de mutação causadora (BRUGNONI et al., 1999; DE DIEGO et al., 1999a; MOON et al., 2009; WU et al., 2002) e com o efeito da hibridização de subunidades defeituosas e *wild types* (CHEN et al., 2004; KUBISCH et al., 1998). Também, em humanos, aspectos como o gênero (COLDING-JORGENSEN et al., 2003; FEZA et al., 1998) e a idade (BECKER, 1977; THOMSEN, 1876) foram propostos para justificar essa variação fenotípica, embora nem mesmo estudos do perfil de expressão gênica (DUNO et al., 2004) tenham demonstrado alguma relação. Além disso a estrutura peculiar do *CLC1*, de possuir duas subunidades que interagem e podem funcionar independentes entre si, também contribui para heterogeneidade dos diversos fenótipos resultantes de mutações no gene *CLCN1* (PORTARO et al., 2015).

A dosagem sérica das enzimas hepáticas e musculares usualmente não apresentam anormalidades em humanos (SAMAHHA et al., 1967) e

gatos (TOLL; COOPER; ALTSCHUL, 1998) acometidos por miotonia herediária, e não são considerados na maioria das descrições dessa enfermidade (BORGES et al., 2013; BRUGNONI et al., 2013; GANDOLFI et al., 2014; MONTEAGUDO et al., 2015; RHODES et al., 1999). No presente estudo, todos os suínos avaliados, em ambos os momentos de coleta considerados, apresentaram valores bioquímicos acima da referência para AST, ALT, DHL e CK. Entretanto os valores de referência de para essas enzimas é muito variável nessa espécie animal e estariam dentro da normalidade considerando outros trabalhos (FRIENDSHIP et al., 1984; KLEM et al., 2010). Estudos tem demonstrado grande variação dos valores de referência para as dosagens rotineiras de bioquímica sérica de suínos normais. Fatores como alimentação, categoria animal, raça, idade, sexo e prenhez influenciam consideravelmente esses valores (BROCKUS et al., 2005; COOPER et al., 2014; ELBERS et al., 1994; FRIENDSHIP et al., 1984; KLEM et al., 2010). Como não foram realizados grupos controles para essas variáveis, não podemos afirmar que esses valores de bioquímica sérica estão realmente acima da normalidade. Portanto, não podemos afirmar que os valores de bioquímica sérica são relevantes para o diagnóstico de miotonia herediária em suínos.

Os resultados do exame histopatológico demonstraram hipertrofia de algumas fibras musculares dos animais afetados. Não foram encontradas alterações de distrofia muscular, corroborando com as descrições de miotonia herediária em várias espécies animais (BORGES et al., 2013; BRYANT; LIPICKY; HERZOG, 1968; GANDOLFI et al., 2014; MONTEAGUDO et al., 2015). Os resultados do EMG corroboram com aqueles descritos para humanos e animais (BORGES et al., 2013; FINNIGAN et al., 2007; GANDOLFI et al., 2014; WIJNBERG et al., 2012a), caracterizado por um padrão clássico de descargas miotônicas espontâneas que diminuem em amplitude e frequência, apresentando som *diver bomb* característico (KIMURA, 1989; MICHELL, 2013; PRESTON; SHAPIRO, 1998). Esses resultados possibilitaram a classificação da miotonia verificada em suínos na categoria 1, reforçando a suspeita de uma canalopatia de canal de cloro muscular (HEATWOLE;

STATLAND; LOGIGIAN, 2013; MILLER, 2008).

O alinhamento das sequências dos transcritos do *CLCN1* obtidas dos animais experimentais com a sequência referência X1 (XM_021078561.1) demonstrou a existência de 3 e 12 polimorfismos para as sequências dos animais *wild type* e os animais miotônicos, respectivamente. Para os animais *wild type* nenhum dos polimorfismos modificam o aminoácido codificado. Para os animais miotônicos, somente dois desses polimorfismos são codificantes para aminoácidos diferentes, c.226 G>A e c.2759 T>C resultando na substituição de um resíduo de Metionina por Valina e de um resíduo de Alanina por Valina, respectivamente, nas posições 76 e 920 da proteína codificada. Entretanto, não se pode atribuir a esses SNPs a causa da miotonia hereditária em suínos, devido ao aspecto de que esses aminoácidos não são conservados nas sequências de aminoácidos das espécies de mamíferos avaliadas, ocorrendo sequências que compartilham o resíduo de Valina nas respectivas posições. Outro aspecto é que aminoácidos hidrofóbicos, como é o caso dos aminoácidos envolvidos nessas substituições, frequentemente podem ser substituídos por aminoácidos do mesmo grupo sem incorrer maiores alterações na estrutura e função da proteína (CASTRO-CHAVEZ, 2010; GOLDBERG; WITTES, 1966).

A maior alteração verificada na sequência dos animais miotônicos consiste na ausência dos nucleotídeos referentes aos éxons 15 e 16 existentes no transcrito X1 (XM_021078561.1), embora ausentes também no transcrito X2 (XM_021078562.1). Utilizando a ferramenta BLAST ficou demonstrado que apenas 5 (2,63%) das 190 sequências de *RNAm* disponíveis banco de dados *Reference sequence* RefSeq - NCBI são homólogas para o transcrito X2. O alinhamento dessas sequências possui baixa cobertura, a maior delas com 58% de cobertura e identidade incompleta. Ademais, essas sequências homólogas são também transcritos alternativos, com exceção da sequência PREDICTED: Bison bison bison chloride channel, voltage-sensitive 1 (*CLCN1*), mRNA (XM_010834009.1), que é único transcrito anotado para a espécie. Entretanto, a sequência da proteína resultante desse transcrito está anotada como XP_010832311.1 "LOW QUALITY PROTEIN: chloride

channel protein 1”, indicando que a sequência XM_010834009.1 correspondente foi modificada em relação à sequência do genoma para corrigir possíveis erros de emparelhamento (O’LEARY et al., 2016). Dessa forma, fica evidente que o transcrito alternativo X2, sem os nucleotídeos referentes aos éxons 15 e 16, é pouco frequente e geralmente consiste em um transcrito alternativo. Portanto, o Bisão americano é a única espécie que possui esse transcrito como principal, entretanto com a ressalva de que provavelmente esse transcrito não seja codificante para uma proteína funcional.

Com o sequenciamento Sanger da região entre os íntrons 14 e 17 dos animais afetados, foram identificados 35 polimorfismos, 1 inserção e 2 deleções. A inserção, a menor das deleções e todos esses polimorfismos são existentes em regiões de íntrons e longe das junções éxons/íntrons. Existem doenças genéticas humanas descritas causadas por mutações internas em íntrons (CUNHA et al., 2016; DEHAINAULT et al., 2007; VAZ-DRAGO; CUSTODIO; CARMO-FONSECA, 2017), inclusive enfermidades miotônicas como a DM1 e DM2 (BÉROUD et al., 2018; BROOK et al., 1992; GONORAZKY et al., 2016; RANUM et al., 1998), entretanto, não existe descrição de miotonia congênita/hereditária relacionada à mutações internas em íntrons em nenhuma espécie. Além disso, essas regiões de íntrons do *CLCN1* apresentam elevada variabilidade, e dessa forma, torna-se complexo e fora da abrangência do presente estudo, avaliar se esses polimorfismos interferem com a função ou expressão do *CLC1*.

A maior das deleções consiste de 4165 nucleotídeos, localizada entre os íntrons 14 e 17, incluindo dessa forma os nucleotídeos referentes aos éxons 15 e 16. Embora deleções de éxons são a causa frequente de MC em humanos (RAJA RAYAN et al., 2012a) entretanto as mutações relacionadas consistem em defeitos no processo de *splicing* (MAZON et al., 2012; ULZI et al., 2012). Não existia, até o momento, descrição de deleção genômica envolvendo éxons como mutações causadoras de MC em nenhuma espécie.

Esse é o primeiro estudo a descrever a miotonia hereditária afetando suínos e também o primeiro estudo a descrever uma deleção

genômica envolvendo éxons do gene *CLCN1*, acometendo uma espécie animal. A alteração genética causadora da miotonia hereditária em suínos consiste de uma deleção de 4165pb de extensão no genoma (NC_010460.4 g. del 6912538_6916702), englobando os éxons 15 e 16 que dessa forma, não são transcritos (XM_021078561.1 c. del 1583_1930).

A implicância biológica dessa deleção causar a miotonia hereditária nos suínos é suportada por várias características. Primeiramente, pode-se verificar que todos os 9 animais miotônicos e seus progenitores são respectivamente homozigotos e heterozigotos para NC_010460.4 g. del 6912538_6916702. Somado a esse aspecto, o teste de genotipagem padronizado possibilitou verificar que 100% (150/150) das amostras dos suínos não relacionados à família de animais miotônicos, foram classificados como homozigotos *wild type* para g. NC_010460.4 del 6912538_6916702.

De forma semelhante ao presente estudo, a ausência dos nucleotídeos referentes aos éxons 15 e 16, também foi considerada como o defeito molecular causador de miotonia hereditária em gatos, entretanto o mecanismo envolvido nessa condição estava relacionado à uma forma de *splicing* alternativo e não uma deleção genômica (GANDOLFI et al., 2014). Na mesma região da deleção verificada no presente estudo, uma mutação pontual c.1775 A>C foi descrita como causadora de miotonia hereditária na espécie equina (WIJNBERG et al., 2012a) e duas substituições de aminoácidos caracterizaram a criação de peixes-zebra modelos dessa enfermidade para humanos (CHENG et al., 2014). Além disso, pelo menos seis mutações decorrentes de SNPs (substituição única de nucleotídeo), localizadas na região da mutação descrita no presente estudo g. NC_010460.4 del 6912538_6916702, foram descritas como causadoras de miotonia congênita em humanos (BURGUNDER et al., 2008; KATSUMATA et al., 1998; KUBISCH et al., 1998; LEHMANN-HORN et al., 1995; LIU et al., 2015).

A proteína *CLC1* apresenta alta homologia (STAUBER; WEINERT; JENTSCH, 2012) e conforme verificado nesse trabalho, o alinhamento da sequência de aminoácidos de 12 diferentes espécies de mamíferos

(Figura 27) permitiu verificar que a região de 116 aminoácidos relativos à deleção observada nos animais miotônicos é altamente conservada e apresenta 92,2% de identidade absoluta e 97,5% de identidade relativa entre todas as espécies.

A modelagem de proteínas transmembrana consiste em um desafio, principalmente devido à baixa identidade entre as sequências utilizadas e os modelos estruturais disponíveis (LOUET et al., 2017). No entanto, mesmo com uma identidade entre as sequências próximo 20% (OLIVELLA et al., 2013) as proteínas transmembranas compartilham muita semelhança na conformação espacial de regiões centrais. Dessa forma, a estrutura adotada na presente pesquisa obtida por modelagem, além de satisfazer valores de qualidades comparados aos de proteínas nativas, apresentou uma identidade de sequência de 43,49% com o modelo de canal *CLCK* bovino 5TQQ utilizado (PARK; CAMPBELL; MACKINNON, 2017), consistindo dessa forma uma estrutura representativa do *CLC1* suíno. Considerando a revisão bibliográfica, essa é a primeira vez que se modela o canal *CLC1*. No entanto, não foi possível construir a porção N-terminal, e consideráveis gaps podem ser notados no alinhamento.

Em relação a estrutura do canal *CLC1* suíno, a deleção g. NC_010460.4 del 6912538_6916702 corresponde a aminoácidos que participam de regiões importantes da estrutura do canal *CLC1*, como parte da α -hélice O e inteiramente as α -hélices P,Q e R. Vale salientar que além da α -hélice R ser a transição entre a porção transmembrana e a porção citoplasmática c-terminal do *CLC1*, ela também possui o resíduo de Tirosina (Tyr-578) que participa da formação do poro seletivo para o íon Cl⁻. Esse resíduo é conservado em várias estruturas terciárias caracterizadas de co-transportadores *CLC* e canais do tipo *CLC* (DUTZLER et al., 2002; DUTZLER; CAMPBELL; MACKINNON, 2003; FENG et al., 2010; JAYARAM et al., 2011; LIM; STOCKBRIDGE; MILLER, 2013; PARK; CAMPBELL; MACKINNON, 2017).

A deleção g. NC_010460.4 del 6912538_6916702 também implica a ausência de 58,33% (35/60) dos aminoácidos que formam o primeiro domínio CBS. Os domínios CBS estão envolvidos em várias funções biológicas de diversas proteínas, e os canais tipo *CLC* de eucariotos e

parte dos canais tipo *CLC* de procariotos possuem uma longa extremidade C-terminal e um par de domínios CBS (BATEMAN, 1997; DUTZLER et al., 2002; FENG et al., 2010; MARKOVIC; DUTZLER, 2007b; MEYER; DUTZLER, 2006; PARK; CAMPBELL; MACKINNON, 2017). As funções biológicas dos domínios CBS no *CLC1* ainda não estão bem conhecidas, acredita-se que modulam a atividade do canal *CLC1*, principalmente por ligação com ATP e influência pelo PH e temperatura (BENNETTS et al., 2005, 2012; BENNETTS; PARKER; CROMER, 2007; TSENG; BENNETTS; CHEN, 2007). A importância é ressaltada devido à mutações envolvendo os domínios CBS serem descritas causando miotonia congênita em humanos, por exemplo, mutações envolvendo o primeiro domínio CBS causando essa enfermidade com padrão recessivo (CHEN et al., 2004; DE DIEGO et al., 1999a; SASAKI et al., 1999) semelhante ao presente estudo.

Uma característica importante da deleção NC_010460.4 g. del 6912538_6916702, descrita nesse estudo, é que não ocorre mudança da fase de leitura do RNAm, e dessa forma o nucleotídeos referentes aos éxons 17 até o 23 estão presentes e provavelmente são traduzidos de forma semelhante aos animais *wild types*. Entretanto, não foi possível a modelagem por homologia da estrutura terciária do *CLC1* dos animais miotônicos, pois a ausência dos 116 aminoácidos (aminoácidos 528 a 643) decorrentes da deleção modifica a sequência da proteína *CLC1*, e assim os aminoácidos reposicionados nessa região não possibilitam um alinhamento adequado, e dessa forma impossibilitam a construção de estruturas satisfatórias.

Esse possível reposicionamento dos aminoácidos é relativo à extremidade carboxi-terminal do *CLC1*. Em um estudo realizado em 1997, Hryciw *et al.* avaliaram o efeito da remoção da extremidade carboxi-terminal do *CLC1* (*Rattus norvegicus*) sobre a expressão gênica, proteica e função do canal (*patch-clamp*). Para isso a remoção foi realizada em cinco pontos diferentes, removendo os últimos 72 (fs923X), 100 (fs895X), 125(L869X), 398(N596X) e 420(Q574X) aminoácidos respectivamente para cada ponto. Nesse estudo, ficou demonstrado que em fs923X e fs895X houve diminuição do funcionamento do *CLC1*; em

L869X, embora houvesse expressão gênica e proteica, não foi verificada nenhuma atividade do *CLC1* resultante; e em N596X e Q574X não foram verificadas expressão proteica e nenhuma atividade do *CLC1* resultante. Embora não tenha sido possível a obtenção por da estrutura terciária do *CLC1* suínos afetados, se for considerado que os aminoácidos reposicionados não determinem prejuízo à função do *CLC1*, esse posicionamento ocasionaria conseqüentemente a ausência dos 116 aminoácidos finais da extremidade carboxi-terminal, e dessa forma, seria semelhante aos *CLC1* mutantes fs923X e fs895X.

Várias etapas de investigação molecular foram necessárias conforme avançava-se o conhecimento sobre o defeito molecular causador da MC em suínos. Um aspecto interessante nessa espécie, é a existência de dois transcritos para o gene *CLCN1*. Com a análise da sequência codificante desses transcritos, pode-se verificar que o transcrito X1 (XM_021078561.1) possui 23 éxons e o transcrito X2 (XM_021078562.1) apenas 21, por não possui os nucleotídeos referentes aos éxons 15 e 16, a ausência desse éxons consiste na mesma alteração descrita nesse estudo envolvendo os suínos afetados por MC.

O *splicing* alternativo do RNAm é um dos muitos mecanismos que participam da regulação da expressão gênica e é fundamental para a existência da complexa diversidade proteica em eucariotos (GRIFFITHS et al., 2016; PAN et al., 2008; WANG et al., 2008). Pelo menos 95% dos aproximadamente 2500 genes do genoma humano produzem transcritos resultantes do *splicing* alternativo (PAN et al., 2008; WANG et al., 2008). Esse mecanismo tem sido descrito ocorrendo também em genes codificadores de canais iônicos, como por exemplo, em canais de cloro ativados por cálcio (*Anoctamin-1*) possibilitando que diferentes isoformas das proteínas sejam sintetizadas e sendo funcionalmente caracterizadas por diferentes sensibilidades ao seu ativador (FERRERA et al., 2009). Outro exemplo é o gene *Anoctamin-2*, para o qual foi demonstrado que o *splicing* alternativo leva a co-expressão de dois transcritos, e a existência de proteínas heterodímeras com propriedades funcionais semelhantes à nativa, indicando que a proteína nativa pode ser heterodímera em vez de homodímera como se aceitava (PONISSERY SAIDU et al., 2013).

Em relação a família *CLC*, transcritos alternativos foram descritos para o *CLCN3* de humanos com diferentes funções e níveis de expressão (OGURA et al., 2002), e de ratos com co-expressão de duas isoformas produzindo canais funcionais (SHIMADA et al., 2000); o *CLCN2* de ratos (CHU et al., 1996; CHU; ZEITLIN, 1997) e de suínos (LOEWEN et al., 2000), e do *CLCN6* de humanos (EGGERMONT et al., 1997), porém esses estudos não demonstraram a existência ou não de alterações funcionais. Já para os canais *CLCN1* e *CLCN5*, transcritos alternativos são descritos sempre relacionados à miotonia congênita e à doença de Dent, respectivamente (BORGES et al., 2013; CHARLET-B et al., 2002; CHEN et al., 2004; FORINO et al., 2004; GANDOLFI et al., 2014).

Já foram demonstradas diferenças nos níveis de expressão relativos, comparando humanos afetados por MC com modo de herança dominante e com modo de herança recessivo (DUNO et al., 2004), sendo verificado que os dominantes apresentavam o dobro de expressão do *CLCN1* em relação aos acometidos por miotonia congênita sob modo recessivo. Entretanto, o presente estudo, é o primeiro a comparar a expressão relativa considerando indivíduos *wild type*, heterozigos e homozigotos para um mesmo defeito molecular causador de miotonia hereditária sob modo de herança recessivo. Ficou demonstrado que os suínos afetados, heterozigotos e *wild types* expressaram o produto P8 de forma semelhante. Esse resultado corrobora com o observado por Imbrici et al. (2016), que verificou que a quantidade relativa expressa de *CLCN1* de um humano miotônico, estava dentro da faixa de valores referente aos humanos *wild type*. Entretanto, diferentemente do presente estudo envolvendo suínos afetados por miotonia hereditária sob modo recessivo (Becker), em seu estudo Imbrici et al., utilizou um humano carreador afetado por MC sob padrão dominante (Thomsen).

De forma inédita também, demonstramos que animais *wild type* expressam um transcrito sem os nucleotídeos referentes aos éxons 15 e 16. Embora a sequência do transcrito alternativo X2 (XM_021078562.1) já estivesse disponível no banco de dados Refseq (NCBI), sendo caracterizada por não possuir os éxons 15 e 16, e dessa forma,

semelhante ao transcrito decorrente da deleção g. NC_010460.4 del 6912538_6916702 descrita nos suínos miotônicos no presente estudo, não era possível afirmar que suínos *wild type* para g. NC_010460.4 del 6912538_6916702 expressavam esse transcrito alternativo. Os suínos *wild type* expressam aproximadamente 6% da quantidade expressa pelos suínos afetados desse transcrito sem os éxons 15 e 16. Não existe descrição em nenhuma espécie animal de transcrito alternativo do gene *CLCN1* sem estar relacionado à miotonia congênita/hereditária, e dessa forma, não existe estudo atribuindo função a um transcrito alternativo do *CLCN1*.

Embora existam mecanismos de controle que impedem a tradução de transcritos alternativos como o *Nonsense-mediated mRNA decay* (HUG; LONGMAN; CÁCERES, 2016; MCILWAIN *et al.*, 2010; MEDGHALCHI *et al.*, 2001; WITTKOPP *et al.*, 2009), é possível que ocorra tradução desse transcrito alternativo expresso nos suínos *wild type*. Estudos de expressão proteica poderiam quantificar essa situação e também demonstrar sua existência ou não bem como seus efeitos e até mesmo a existência de heterodímeros de CLC1, ou seja, canais *CLC1* híbridos formados por duas subunidades distintas, uma *wild type* e uma mutante. Vale salientar que a expressão de heterodímeros de *CLC1 wild type*/mutantes já foi descrita em humanos (LIN *et al.*, 2006; SIMPSON *et al.*, 2004). É provável que outras espécies animais expressem transcrito semelhante ao decorrente da deleção g. NC_010460.4 del 6912538_6916702, ou seja sem os éxons 15 e 16, principalmente as espécies animais que compartilham transcritos alternativos semelhantes ao X2 de suínos (XM_021078562.1) disponíveis no banco de dados Refseq (NCBI), como o *Bos taurus*, *Bos indicus*, *Cercocebus atys*, *Bison bison bison* e *Macaca fascicularis*.

O presente estudo não avaliou a expressão proteica, e nem a funcionalidade do *CLC1* mutante para g. NC_010460.4 del 6912538_6916702, entretanto, é esperado que essa deleção reduza em pelo menos 70% a condutância ao iôn CL⁻, pois é o mínimo necessário para que ocorre miotonia (BRYANT, 1969; BRYANT; LIPICKY; HERZOG, 1968; FURMAN; BARCHI, 1978; KOCH *et al.*, 1992a).

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 α -hélices O, P, Q e R, o resíduo de Tirosina (Tyr-578) que participa da formação do poro seletivo para o íon Cl⁻ 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 β -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>. 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⁻ channel beta-subunit crucial for renal Cl⁻ reabsorption and inner ear K⁺ 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⁻/H⁺ 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⁻/H⁺ 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>.

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.

WHEELER, T. M. et al. Reversal of RNA dominance by displacement of protein sequestered on triplet repeat RNA. **Science (New York, N.Y.)**, v. 325, n. 5938, p. 336–339, jul. 2009.

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

WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION. **International Classification of Diseases ICD - 10**. Disponível em: <<http://apps.who.int/classifications/icd10/browse/2016/en#/G71.1>>.

WIEDERSTEIN, M.; SIPPL, M. J. ProSA-web: interactive web service for the recognition of errors in three-dimensional structures of proteins. **Nucleic Acids Research**, v. 35, n. suppl_2, p. W407–W410, 1 jul. 2007.

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

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

WITTKOPP, N. et al. Nonsense-Mediated mRNA Decay Effectors Are Essential for Zebrafish Embryonic Development and Survival . **Molecular and Cellular Biology**, v. 29, n. 13, p. 3517–3528, 4 jul. 2009.



WU, F. F. et al. Novel CLCN1 mutations with unique clinical and electrophysiological consequences. **Brain**, v. 125, n. Pt 11, p. 2392–2407, 2002.

ZIFARELLI, G.; PUSCH, M. CLC chloride channels and transporters: a biophysical and physiological perspective. **Reviews of physiology, biochemistry and pharmacology**, v. 158, p. 23–76, 2007.

ZIFARELLI, G.; PUSCH, M. CLC chloride channels and transporters. In: ZHENG, J.; TRUDEAU, M. C. (Eds.). . **Handbook of Ion Channels**. [s.l: s.n.]. p. 463–476.

XII - ANEXOS

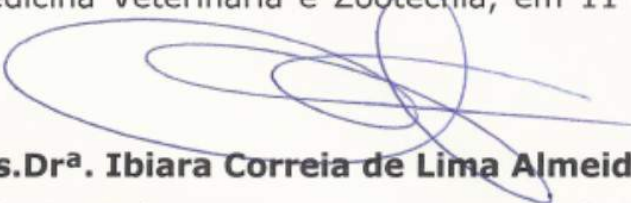
ANEXO 1 - Autorização pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da FMVZ-UNESP (protocolo nº 169/2015)

	UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE MESQUITA FILHO"	 Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia Campus de Botucatu
---	---	---

A T E S T A D O

Atesto para os devidos fins, que o Projeto de Pesquisa "**Estudo clínico e molecular de miotomia hereditária em suínos**" Protocolo nº 169/2015 - CEUA, do Professor Alexandre Secorun Borges, a ser conduzido por **César Erineudo Tavares de Araújo**, foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) desta Faculdade.

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, em 11 de dezembro de 2015.


Prof^a.Ass.Dr^a. Ibiara Correia de Lima Almeida Paz
Presidente da CEUA da FMVZ, UNESP - Campus de Botucatu

ANEXO 2 - Trabalho científico a ser submetido para o periódico PLOS Genetics

A novel mutation in *CLCN1* associated with hereditary myotonia in pigs.

C. E. T. Araújo¹, J. P. Oliveira-Filho¹, Araújo-Júnior J. P.², Barbosa J. D.³, Oliveira C. M. C., Resende L. A. L.⁴, McCue M. E.⁵, A. S. Borges^{1*}

¹ School of Veterinary Medicine and Animal Science, Universidade Estadual Paulista, Department of Veterinary Clinical Science, Botucatu, São Paulo, Brazil

² Department of Microbiology, Institute of Biosciences, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, São Paulo, Brazil

³ Instituto de Medicina Veterinária, Universidade Federal do Pará, *Campus* Castanhal-PA, Brazil

⁴ Department of Neurology, Faculty of Medicine, Univ Estadual Paulista (UNESP), Botucatu, Brazil

⁵ College of Veterinary Medicine, University of Minnesota, St Paul, Minnesota 55108, USA

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. Mutations in the *CLCN1* gene have been described as causing hereditary myotonia in several animal species. There is no report of hereditary myotonia in swine. The aim of this study was to perform the clinical and molecular characterization of hereditary myotonia in swine. The hypothesis of this study was that nine animals with compatible clinical signs had hereditary myotonia. Twenty-six animals were evaluated under clinical, electromyographic, histopathological and molecular aspects. The clinical signs verified were muscular hypertrophy, stiffness and myotonia. No muscular dystrophy was observed at the histopathological examination and myotonic discharges were observed during EMG. Using cDNA samples from affected animals, the exons 15 and 16 of *CLCN1* were absent. This absence is the same compared to the annotated X2 alternative transcript of swine *CLCN1*. In genomic DNA a large deletion of 4165bp (g NC_010460.4 del 6912538_6916702) was found in the region of the *CLCN1* gene. Wild-type animals also had present expression levels for the X2 transcript, that was 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 swine myotonia and also a description of a genomic deletion in the region of the *CLCN1* gene associated with hereditary myotonia. 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.

Author Summary

Myotonia congenita is a rare hereditary muscle disorder described in many animal species. In the present study, we describe a genomic deletion in the *CLCN1* gene causing the recessive form of hereditary myotonia in pigs. This mutation consists in the absence of nucleotides coding for 116 amino acids residues of the *CLC1* protein. Paradoxically, we demonstrated that wild-type animals express the same form of the mutated *CLCN1* gene, but in low levels. These findings highlight some questions, what the function of expression of this variant of the *CLCN1* gene? If this mutated form is translated in wild-type animals, could exist *CLC1* mutated protein in muscle tissue of this animals? Could exist heterodimers of *CLC1* protein?

INTRODUCTION

Mutations in the *CLCN1* gene are the main cause of non-dystrophic myotonias, called myotonia congenita also called hereditary myotonia (HM) [1], [2]. This gene codifies the main chloride channel - *CLC1* - of the skeletal muscle tissue [1]–[3]. The function of *CLC1* is essential to ensure sarcolemmal electrical stability. In rest, the chloride conductance of skeletal muscle represents 85% of all conductance [4]–[6]. Impairing the *CLC1* function leads to MC by the occurrence of depolarization's on membrane surface resulting in a delay in muscle relaxation [6]–[9].

The *CLC1* channel is a homodimer protein, member of the *CLC* protein family [10]–[12]. Each sub-unit can function independently, and like others *CLC* channels, *CLC1* was comprised by 17 α -helices forming a transmembrane domain and 2 intracellular cystathionine beta-synthase (CBS) domains [10], [13]–[17]. Therefore, the 3D structure of *CLC1* channels remaining not determined, also the correlation of the structure with the functions of *CLC1* channel are not well understood. Nevertheless, several *CLC* homologs with known 3D structures were reported, as the bacterial *Escherichia coli* *CLC* transporter (EcCLC) [10], the eukaryotic *CLC* transporter (CmCLC) [16] and the bovine CLC-k [17].

Several descriptions of HM affecting humans were documented, with dominant and recessive patterns, and more than 200 mutations were described causing HM [18]. In animals, HM was described affecting rat [19], goats [9], dogs [20], [21], horse [22], buffalo [23], kittens [24], zebrafish [25] and sheep [26]. Although HM was described in calves, no mutations in *CLCN1* were identified in this species. Humans and animals affected by MC present variable phenotype, mainly considering the intensity of the clinical signs [23], [24], [27]–[30]. Usually, the affected animals present myotonia, muscle hypertrophy, stiffness, weakness, and warm up phenomenon [23], [24], [27], [31]–[33]. Until

the present moment, there is no report describing myotonia in pigs, the aim of this study was to describe the clinical and molecular features of HM affecting pigs.

RESULTS

CLINICAL EVALUATION

Except for muscular sings, no clinical abnormality was observed. The onset of the clinical signs was verified within one week of life that were progressives with the advancing of the age of these animals. All nine affected animals present the same clinical sings with variable intensity. These signs included myotonia, muscle hypertrophy, and stiffness. Muscle stiffness was present in thoracic limbs and was more pronounced in the pelvic limbs. Muscle hypertrophy was mainly present in the epaxial and proximal muscles of the limbs, especially the gluteus muscles, semimembranosus and semitendinosus (Figure 1).



FIGURE 1 - A - posterior view of two animals affected by HM, note the muscular hypertrophy in the pelvic limb. B - lateral view demonstrating muscular hypertrophy in the left pelvic limb. C - left pelvic limb with hypertrophy and stiffness.

Usually, after a rest period, when these affected animals were stimulated to move, they presented intense stiffness of skeletal muscles which led to the fall, characterizing the startle response (Figure 2). After falling down, these animals were remaining in decubitus positions, usually for less than one minute. Two of them presented a more intense form of startle response with the

remaining time of decubitus up to two minutes. The warm-up phenomenon was evident in all affected animals.



FIGURE 2: A sequence of images obtained from a video demonstrating two affected animals. Note the muscular and the episode of intense muscular rigidity after the sound stimulus of clapping, followed by fall and decubitus (pictures from 1 to 7). Then the animals recover from the intense stiffness and are able to lift (pictures 8 to 16). In the movie, the time interval between the first and last images was 8 seconds.

Among the affected animals, two had the most intense muscular rigidity and startle response, the falls due to muscular rigidity were easily triggered with little environmental stimulation. These animals remained in decubitus position for more than one minute. Two other animals presented a mild form of muscle stiffness resulting from the startle response and did not present decubitus due to stiffness. Considering this phenotypic heterogeneity, affected pigs could be classified into three levels of intensity of clinical signs as shown in table 1.

TABLE 1: Intensity grade of the main clinical signs verified in the swine affected by HM.

Intensity	Muscle hipertrophy	Muscle stiffness	<i>Startle response</i> leads to fall
Mild	evident	+	-
Moderate	evident	+	+
Intense	evident	++	++

Muscle stiffness: + moderate, ++ intense.

Startle response: - absent, + present, with permanation time of decubitus lessa than 1 minute, ++ present, with permanation time of decubitus higher than 1 minute.

Among those affected, three adult animals that presented the intense form of myotonia and came to death due to muscle stiffness crises that occurred without sun shelter. At necropsy examination, in addition to skeletal muscle hypertrophy, no additional abnormalities were observed. A recessive pattern of inheritance was verified (Figure 3).

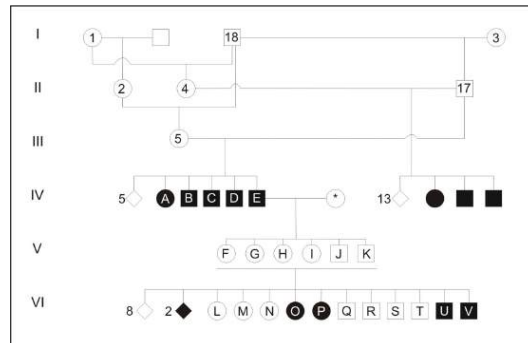


FIGURE 3: Heredogram of the family experimental animals (A-V). Note that the common ancestor # 18 is the parent of individuals 4, 5, and 17, which, in turn, produced animals affected by HM. * Large White nut without parentage relationship with this family.

Upon histopathological evaluation, muscle dystrophic changes were not observed. The muscle fibers presented a normal pattern of organization, with normal connective tissue distribution. Furthermore, when compared to wild-type animals, were observed hypertrophy of muscle fibers in muscle tissue of affected animals. The EMG results showed classical spontaneous myotonic discharges in all evaluated muscles of 4 affected animal (Figure 4). The “diver bomb” sound also referred like an acceleration or deceleration of a motorcycle were present in loudspeaker during the EMG of all the affected animals.

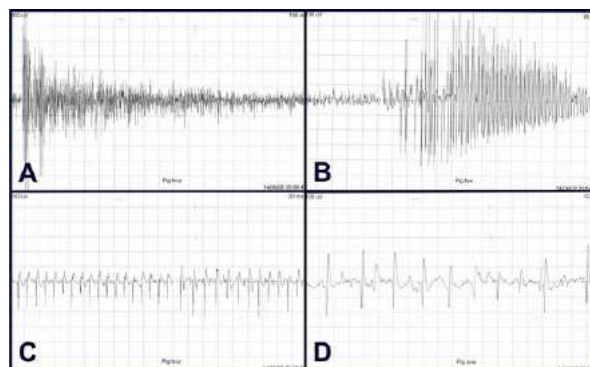


FIGURE 4: A and B – Typical myotonic discharges that wax and wane in amplitude and frequency and produce the characteristic diver bomb noise over the loudspeaker (analysis time of 100 and 50 mSec/div, respectively). C – Sustained run of positive waves with initial sharp positivity followed by a slow negative component (analysis time of 20 mSec/div). D – Sustained run of negative spikes with an initial positivity, like fibrillation potentials (analysis time of 10 mSec/div).

MOLECULAR ANALYSIS

Exons 14 and 15 regions from the cDNA samples of affected animals were not present. With the alignment of the *CLCN1* reference sequence (transcript X1 - XM_021078561.1) and the coding sequences obtained from wild-type and affected animals were observed 3 and 12 nucleotide substitutions, respectively. For wild-type animals, all nucleotide substitutions were synonymous. For affected animals two of twelve nucleotide substitutions were nonsynonymous, the substitutions c.226 A>G and c.2759 C>T (Table 2).

TABLE 2: Nucleotide substitutions verified in wild-type and affected animals when compared to a reference sequence of *CLCN1* gene (XM_021078561.1).

Códon Ref X1 XM_021078561.1	<i>WILD</i> <i>TYPE</i>	MYOTONIC	RESULTING AMINOACID	EXON	POSITION FROM ATG START CODON
GAC	GAC	GAT	Aspartic acid	Exon 2	225
ATG	ATG	GTG*	Methionine>Valine	Exon 2	226
GCA	GCA	GCT	Alanine	Exon 8	978
GGT	GGY (C/T)	GGC	Glycine	Exon 10	1077
CCG	CCG	CCA	Proline	Exon 11	1224
GCT	GCC	GCC	Alanine	Exon 13	1422
GAC	GAC	GAT	Aspartic acid	Exon 14	1524
GGT	GGY (C/T)	ausente	Glycine	Exon 15	1697
GTG	GTG	GTC	Aspartic acid	Exon 21	2436
GCA	GCA	GTA*	Alanine>Valine	Exon 23	2759
CCA	CCA	CCG	Proline	Éxon 23	2802
CCG	CCG	CCA	Proline	Éxon 23	2826
TCA	TCA	TCG	Serine	UTR 3'	2964

* non-synonymous substitution.

The two non-synonymous substitutions were p.M76V and p.A920V. The aminoacids p.76Methionine and p.920Alanine were not conserved between the amino acid reference sequences of the CLC1 protein from 15 different species of mammals (Figure 5).

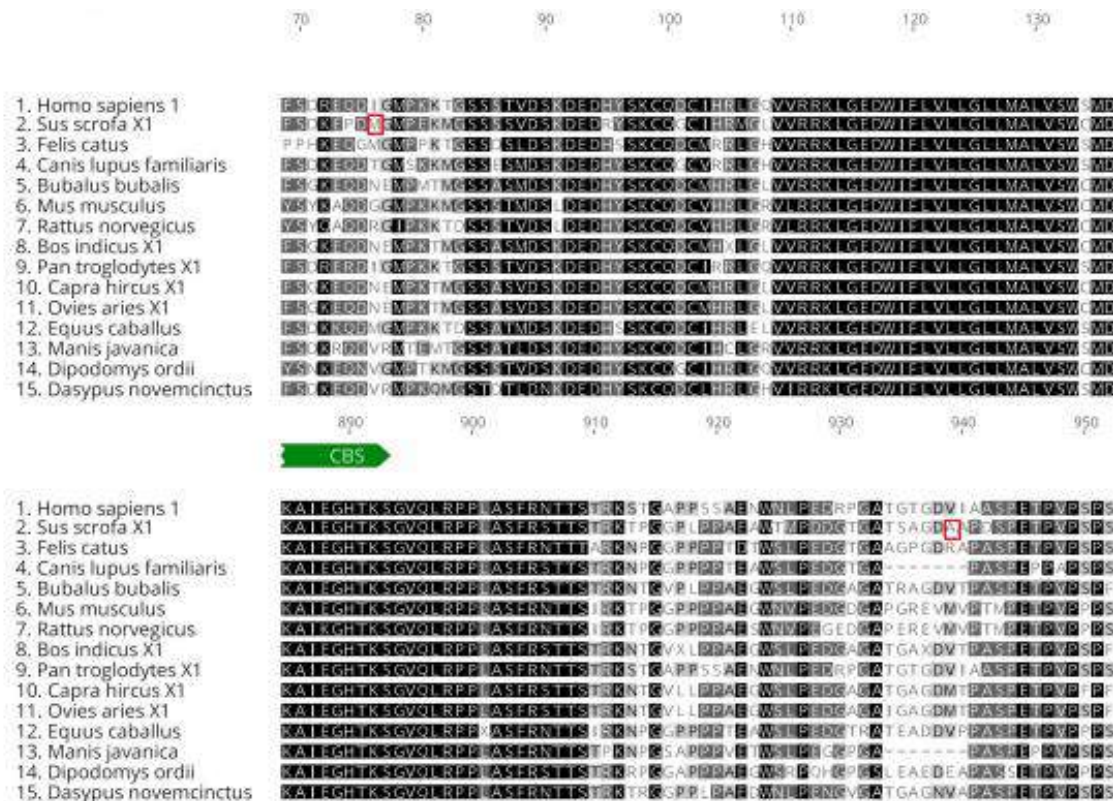


FIGURE 5: Alignment of the amino acid reference sequences of the CLC1 protein from 15 different species of mammals. Sequences are identified according to table 5. Shown in white, gray and black are the different, similar and identical residues, respectively. Highlighted in red squares are the two residue changes found in myotonic animals, p.M76V and p.A920V respectively.

Additionally, when compared the gDNA reference sequence of *CLCN1* gene and the sequences obtained from affected animals of the region between intron 14 and 16, were noticed 35 nucleotide substitutions, one insertion of 4 nucleotides into the intron 14, one absence of 60 nucleotides of intron 16 and mainly another one absence of a region with length of 4165 nucleotides between these introns.

The absence of the 4165 bp evolves partially the introns 14 and 16, and completely the intron 15 and exons 14 and 15 (Figure 6). This deletion (g. NC_010460.4 del 6912538_6916702) comprises 1137 bp of the 5' end of intron 14, 214 bp relatives of exon 15, 245 bp relatives of the intron 15, 134 bp relatives of the exon 16 and 2435 bp of the 3' end of intron 16.



FIGURE 6: Schematic representation of the deletion (g. NC_010460.4 del 6912538_6916702) present in the *CLCN1* gene of all affected animals (rectangle red dashed). The white rectangles represent the exons 14, 15, 16 and 17. The grey rectangles represent the introns 14, 15 and 16.

Using the genotyping test, all affected animals were homozygous for the deletion of 4165bp (del/del). All parents of these affected animals were heterozygous for this deletion (del/N). Five members of the family of the myotonic pigs were the homozygous wild-type (N/N). Additionally, 150 animals from pig farms were the homozygous wild-type (N/N).

PROTEIN *IN SILICO* ANALYSIS

The alignment of predicted amino acid sequences of the *CLC1* protein of wild-type animals with references sequences of *CLC1* protein isoform X1 (XP_020934220.1) of swine and with more 11 mammals species was presented 62.6% of absolute identity (supplementary material 1). When considered only the deletion region of 116 amino acids, the alignment shows 92.2% of absolute identity.

Using the predicted amino acids sequence of wild-type swine and bovine CLC-K structure (5TQQ) as a model, the generated structure *CLC1*-WT-Swine (Figure 7) presents 43.49% of identity (Figure 8), CMQE 0.74, QMEAN -2.89 and ZSCORE (ProSA-web) -6.66.

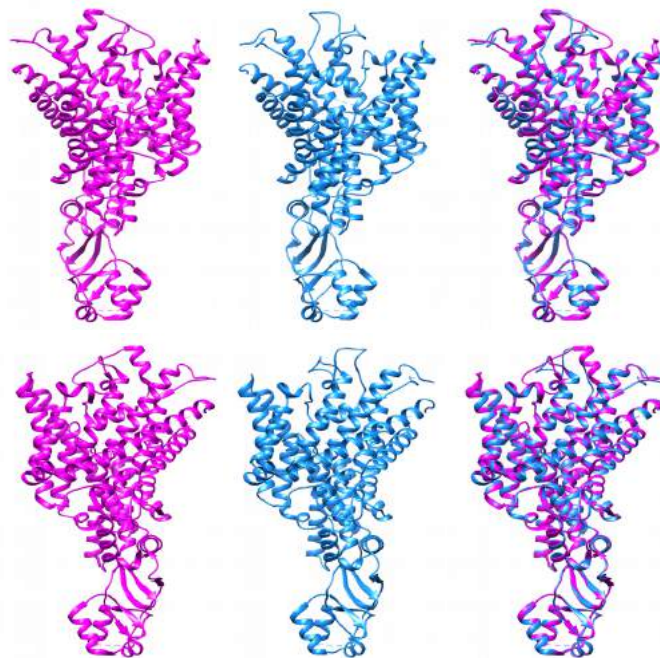


FIGURE 7: Images of the structures of a subunit of *CLC1*, 5TQQ (magenta) and *CLC1*-WT-Swine (cyan). Each sequence of 3 images (each line) the structure is rotated by 180°. Note the high similarity between the model and the generated structure *CLC1*-WT-Swine, especially when overlapping.

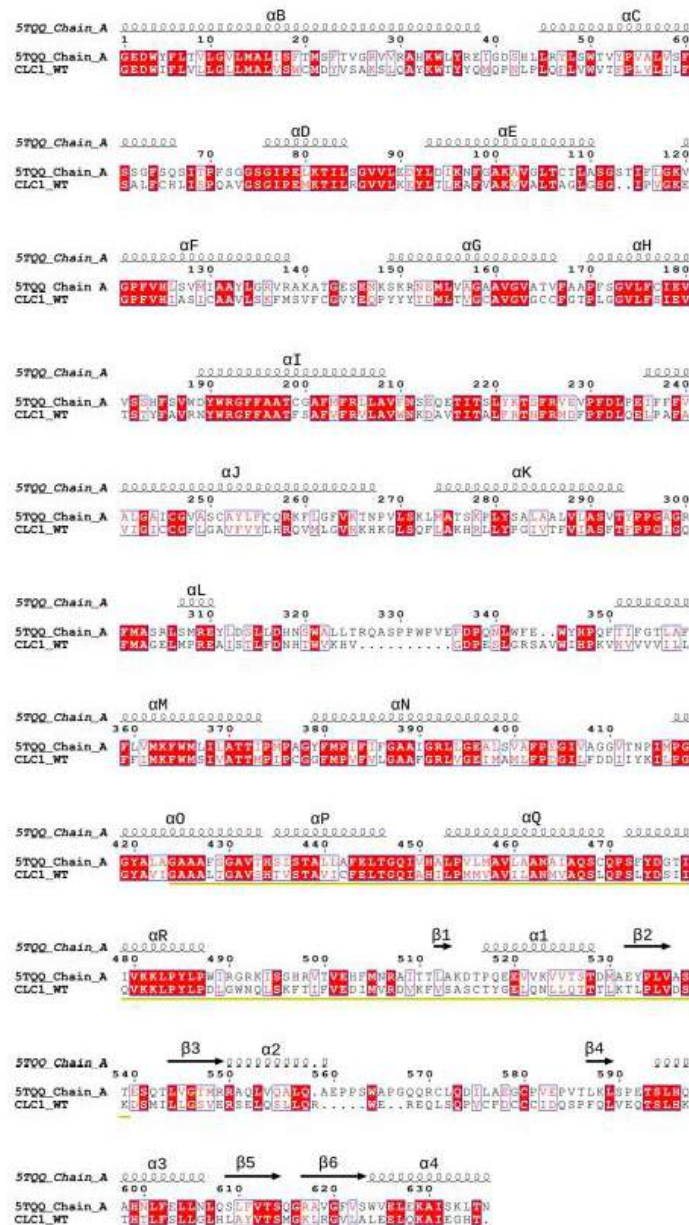


FIGURE 8: Alignment between the amino acid sequence of predicted sequence of wild-type sequenced pigs and the amino acid sequence of the 5TQQ (bovine CLC1) model. The ESPript program was used to display the alignment (Robert and Gouet 2014). The secondary structure is noted above the alignment, α -helices are named A-R as proposed by Dutzler et al. 2002, the conserved residues are marked in red, the 116 amino acids relating to the deletion are underlined in yellow.

Using the predicted amino acids sequence of wild-type swine and bovine CLC-K structure (5TQQ) as a model, the generated structures were not satisfactory to represent a CLC protein. However, using the same structure generated for wild-type animals (*CLC1*-WT-Swine) the deletion (g. NC_010460.4 del 6912538_6916702) corresponds to a region of 116 amino acids which extends from about half of α -helix O to the first half of the first CBS domain (Figure 9).

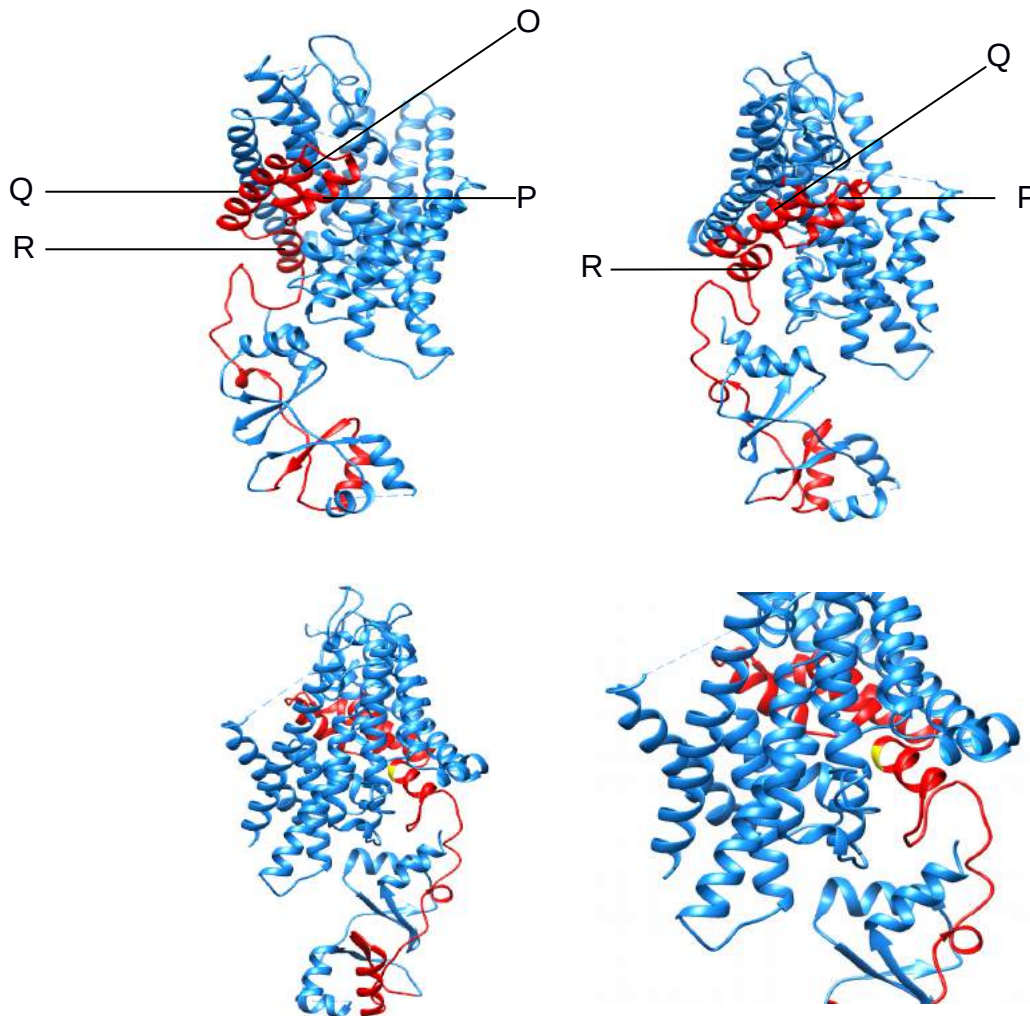


FIGURE 9: Images of the structures of a subunit of *CLC1*-WT-Swine. In red are represented the 116 amino acids related to the deletion verified in myotonic animals. The deletion region comprises about the half of α -helix O to the first half of the first CBS domain. The yellow region represents the Tyrosine residue that participates in the formation of selector pore for the CL⁻ ion.

RELATIVE EXPRESSION

The Δ CT mean values of P8 - amplicon before the deletion - were similar between wild-type, heterozygous and homozygous for the deletion (g. NC_010460.4 del 6912538_6916702) (Table 2). The Δ CT mean values of P15/16 - amplicon inside the region of exons 15 and 16 - were similar between wild-type and heterozygous for the deletion. No amplification relative of P15/16 was observed in samples of homozygous animals for the deletion (Table 2). For the amplicon P14/17, the Δ CT mean values were different between wild-type, heterozygous and homozygous for the deletion (Table 3). Homozygous for

deletion was expressed 9.42 and 15.73 more than heterozygous and wild-type animals. The relative expressions of all tree amplicons are displayed in figure 10.

Table 3: Δ CT mean values of Wild-type, heterozygous and homozygous affected animals for P8, P15-16 and P14/17 products.

GENOTYPE	P8		P15-16		P14/17	
	Δ CT mean	Δ CT SD	Δ CT mean	Δ CT SD	Δ CT mean	Δ CT SD
Wild-type	9,526	0,847	8,455	0,703	15,814	0,286
Heterozygous	9,677	0,635	8,93	0,506	12,578	0,171
Homozygous (myotonic)	9,318	0,999	-	-	11,838	0,048

Δ CT SD the respective values of standard deviation for each genotype group. - were no amplification values for the product P15-16 for homozygous affected animals.

For the amplicon P14/17, the Δ CT mean values were different between wild-type, heterozygous and homozygous for the deletion (Table 2). Homozygous for deletion was expressed 9.42 and 15.73 more than heterozygous and wild-type animals. The relative expressions of all tree amplicons are displayed in figure 9.

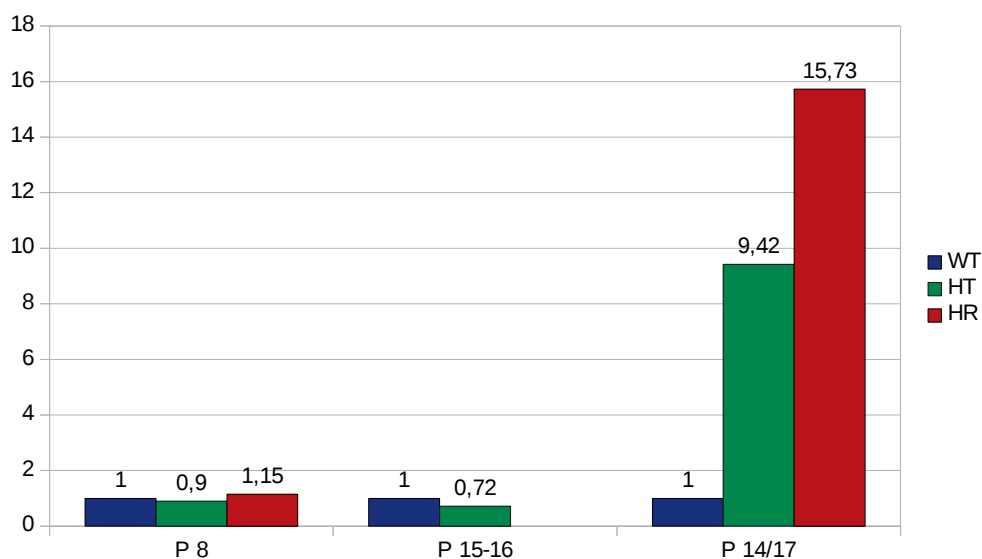


FIGURE 10: Chart of relative expression values for amplicons P8, P15-16 e P14/17 ($2^{-\Delta\Delta CT}$). Blue bars – wild-type animals. Green bars – heterozygous animals. Red bars – homozygous animals (affected ones).

DISCUSSION

In the present study, we describe pigs affected by HM with a recessive pattern of inheritance. In this pattern, the disease is verified in the offspring of unaffected individuals, and the affected progeny includes individuals of both sexes, these two aspects are evident with the analysis of the heredogram [34]. Furthermore, the heredogram construction turns possible to point out the common ancestor.

All affected pigs presented abnormalities related only to the muscular system. The clinical signs verified in the affected pigs were similar to those described in the descriptions of HM affecting humans [28], [35]–[38], goats [9], cats [24], dogs [20], [21], horse [39] and buffaloes [23]. The main clinical signs were muscle hypertrophy and stiffness, startle response with occurring falls and decubitus. In virtue of the vocalization is a normal behavior of swine species, was not possible to confirm if these episodes were accompanied by pain. As it was verified in cats [24], goats [40] and humans [27], [31], [33], the percussion of the triceps muscle produced an evident dimpling of the muscle. However hypertrophic tongue and others abnormalities of the oral cavities described in cats with HM [24] were not observed in pigs.

Muscle wasting and progressive muscle weakness were not observed in the affected pigs. Additionally, upon histopathological exam were verified hypertrophic muscle fiber and no evidence of dystrophic abnormalities. These findings corroborated with a non-dystrophic myotonia [21], [23], [24], [39], [41]. The warm-up phenomenon was verified in all affected pigs and was indicative of HM [41].

It is well known that the clinical signs of HM with the recessive pattern are more intense than those with dominant pattern [33], [35], [42]. However, as it was described in cats [24] and buffaloes [23] with HM, the animals affected by the same mutation can present phenotypic variation. The phenotypic variation is a frequent feature in descriptions of HM affecting humans, in this way, the type of causative mutation [27]–[30], the hybridization of wild-type and mutated subunits of *CLC1* protein [37], [38], gender [43], [44], age [45], [46] and *CLCN1* gene expression [47] have been proposed to have some influence in this variation. However, in myotonic pigs were not verified the influence of age or gender in the phenotypic variation.

The EMG results corroborated with descriptions of HM affecting humans and animals [21], [23], [24], [39], characterized by a classical pattern of myotonic discharges that wax and wane in amplitude and frequency and produce the characteristic diver bomb noise [48]–[50].

The nonsynonymous nucleotide substitutions induce p.76 Met>Val and p.920 Ala>Val amino acids changes and were present in sequences of all

affected animals. However, the cause of HM in these animals cannot be attributed to these two amino acids changes. This is supported mainly because these amino acids are not conserved in mammals sequences of *CLC1* (supplementary material 1), and also because that the hydrophobic amino acids – like Met, Val, and Ala – frequently can be replaced for each other without the occurrence of function impairing of protein involved [51], [52].

The major abnormality verified in *CLCN1* nucleotides sequences of affected pigs, was the absence of exons 15 and 16. However, two alternative transcripts for the *CLCN1* gene of *sus scrofa* were displayed at the Refseq databank [13] and considering the transcript X2 (XM_021078562.1) with also are absent the exons 15 and 16. Similarly, the exons 15 and 16 were absent in the *CLCN1* coding sequence of *Bison bison bison* (XM_010834009.1), X2 of *Bos taurus* (XM_015470764.1), X3 of *Bos indicus* (XM_019959227.1), X4 of *Cercocebus atys* (XM_012057525.1) and 1 of *Macaca fascicularis* (XM_005551037.2). With exception of the coding sequence of *Bison bison bison* (XM_010834009.1), all of these are alternative transcripts. Additionally, the coding sequence of *Bison bison bison* was pointed as “LOW QUALITY PROTEIN: chloride channel protein 1”, indicating that the corresponding XM_ sequence was modified relative to the genome sequence, to correct possible mismatches [13]. Thus, it is evident that the transcript, without the exons 15 and 16 nucleotides, is less frequent and usually consists of an alternative transcript. The *Bison bison bison* is the only species that has this transcript as the unique. However, this transcript is probably not coding for a functional protein.

Considering the genomic region between the intron 14 and 17 of affected pigs, the sequencing reveals nucleotide substitutions, insertions, and deletion in an intronic region. Although were described human genetic disease caused by mutation deep inside the introns regions [53]–[55], including myotonic diseases as the DM1 and DM2 [56]–[59], there are no descriptions of mutation deep inside in the introns regions causing HM in any species. In addition, these intronic regions of the *CLCN1* present high variability. Thus is therefore complex and out of the scope of the present study to assess whether these polymorphisms interfere with the function of the *CLC1*.

In affected pigs, the main genomic abnormality is a large genomic deletion with include two exons. Exons excises, due to defects in the splicing process, were described causing MC in humans [38], [60] and animals [24]. To date, there was no description of genomic deletion including exons as the cause of MC in any species. This is the first description of MC affecting pigs and also the first report of a genomic deletion including exons of the *CLCN1* gene. The deletion of 4165 nucleotides is located between the intron 14 and the intron 17 (NC_010460.4 g. del 6912538_6916702) and includes the exons 15 and 16, that are unavailable for transcription (Figure 11).

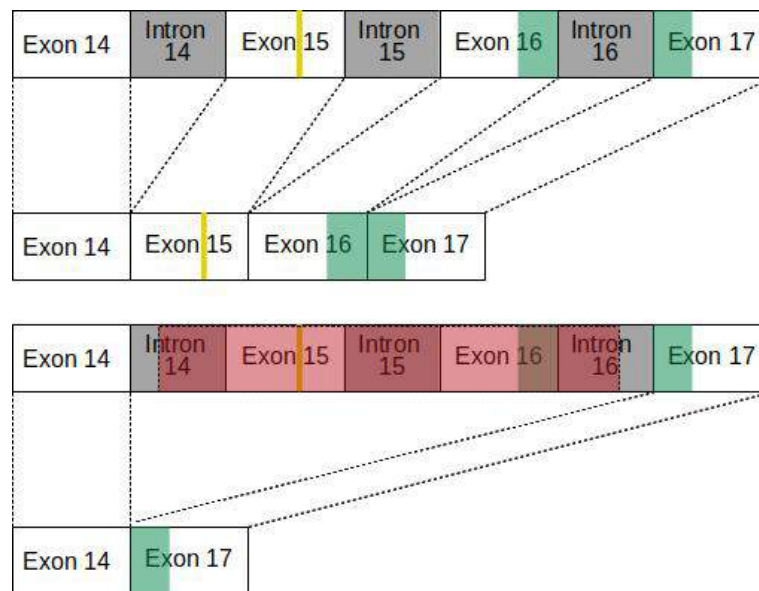


FIGURE 11: Schematic representation of *CLCN1* transcription of the region between exon 14 and exon 17 of wild-type animals (A) and affected pigs (B). The coding region for the first CBS domain is represented by a green rectangle. The yellow line represents the Tyrosine residue that participates in the formation of the selective pore of Cl⁻. The dashed lines represent the processing of splicing. Note the absence of exons 15 and 16 in the transcript of myotonic animals, and consequently the absence of the tyrosine residue and part of the first CBS domain.

The importance of the deletion (NC_010460.4 g. del 6912538_6916702) as the causative of MC in pigs is supported by some aspects. First, all the affected pigs were homozygous and his parents were heterozygous for this deletion. Additionally, 100% (150/150) of farm pigs were homozygous wild-type. Similarly to the effect of this deletion, the absence of exons 15 and 16, due to abnormalities in the splicing process, was described causing MC in cats [24]. Furthermore, in the same region of this deletion, a single nucleotide polymorphism - SNP- was describe causing MC in a horse [61] and two different SNP were developed to the generation of a zebrafish model of MC [25]. Additionally, at least 6 distinct SNP, in the same region of this deletion, were described causing MC in humans [31], [37], [62]–[64].

The *CLC1* protein presents a high level of homology between many organisms [65]. This aspect was corroborated by the alignment of 15 amino acids reference sequences of *CLC1* protein from different mammals (supplementary material 1). Considering only the region of the deletion verified in pigs, this alignment presents 92.2% of absolute identity.

The modeling of transmembrane proteins is challenging, especially

because of the relatively low-sequence identity between the query and the templates [14]. Nevertheless, even with a sequence identity of about 20% transmembrane proteins share a similar fold [66]. The structure generated from consensus sequences of wild-type controls animals – *CLC1*-WT-Swine - presents 43.49% of identity with the template, the bovine CLCK - 5TQQ [17]. Although was not possible to model the cytoplasmic N-terminal part of the *CLC1* protein and considerable gaps can be noticed in the alignment (Figure 5), the *CLC1*-WT-Swine achieve the quality requirements to consist in a representative structure of swine *CLC1*.

The deletion (NC_010460.4 g. del 6912538_6916702) corresponds to amino acids that compound conserved regions of the *CLC1* protein. These regions include part of α -helice O and completely the α -helices P, Q and R. The α -helice R is the transition between the transmembrane and cytoplasmic regions, and have the conserved Tyrosine residue (Tyr-578) with contribute to form the selective pore for Cl⁻ ion. This residue is highly conserved in many determined structures of CLC proteins [16], [17], [67]–[70].

In addition, the deletion (NC_010460.4 g. del 6912538_6916702) also induces the absence of 58.33% (35/60) of amino acids that form the first CBS domain. The eukaryotes CLC channels have a long cytoplasmic C-terminal region, with a couple of CBS domains [16], [17], [71]. The biological relevance of functions of CBS domains in *CLC1* proteins are not yet well known, they are proposed to modulate *CLC1* channel activity, mainly by ATP binding and influence by Ph and temperature [72]–[75]. However, the importance of CBS domains in *CLC1* proteins is highlighted because mutations involving CBS domains are described causing MC in humans, for example, mutations involving the first CBS domain causing MC with recessive pattern [28], [38], [76] similar to the present study.

An important feature of the deletion NC_010460.4 g. del 6912538_6916702, described in this study, is there no frameshift. Thereby, the nucleotides referring to exons 17 to 23 were present and probably translated similarly to wild-type animals. However, homology modeling of the *CLC1* tertiary structure of myotonic animals was not possible, because the absence of the 116 amino acids (amino acids 528 to 643), resulting from the deletion, modifies the *CLC1* protein sequence. Thus, the amino acids repositioned in this region produces a poor alignment with reference models, and accordingly, it was impossible to construct satisfactory structures.

If the replacement of amino acids due to deletion NC_010460.4 g. del 6912538_6916702 induces the fold of the *CLC1* resulting protein like the native amino acids in this region of deletion, would occur the absence of the last 116 amino acids in the sequence of *CLC1*. In a study conducted by Hryciw et al. (1997), they evaluated the effect of excising of the C-terminal portion on the function of *CLC1* (*Rattus norvegicus*). For this, the excising of the C-terminal

were performed in 5 distinct points, the last 72, 100, 125, 398 and 420 amino acids, respectively for each point. The results of this study were demonstrated that the removing of the last 72 and 100 amino acids were impairing the *CLC1* function. Thereby, the potential absence of the last 116 amino acids in swine *CLC1* due to the deletion verified, probably would impair the function of *CLC1*.

Considering the swine species, two transcripts for the *CLC1* are available in RefSeq database [13]. Interesting, the same exons 15 and 16 – related to the deletion causative of MC in pigs – were absent in the X2 transcript (XM_021078562.1). It is well known that at least 95% of human genes produce alternative splicing [77], [78], including genes coding for calcium-activated chloride channels [79], [80]. Regarding the CLC family, alternative splicing was described for the *CLCN3* of humans, with different functions and levels of expression [81], and in rats, with co-expression of two isoforms producing functional channels [82]. Also were described alternative splicing related with *CLCN2* of rat [83], [84] and pigs [85] and with *CLCN6* of humans [86], but these studies did not demonstrate the existence or not of functional alterations. Considering the *CLCN1* and *CLCN5* genes, alternative splicing always were related to MC and Dent's disease, respectively [23], [24], [38], [87], [88]. Differences in relative expression levels of *CLCN1* gene have already been demonstrated, comparing humans affected by MC with dominant inheritance mode with recessive inheritance mode [47]. However, the present study is the first to compare the relative expression considering wild-type, heterozygous and homozygous individuals for the same mutation causing MC. The results demonstrated that the muscle tissue of the homozygous, heterozygotes and wild-types of animals, express the P8 product in similar levels. This result corroborates with that observed in humans [89] affected by MC with the dominant pattern.

Differences in relative expression levels of *CLCN1* gene have already been demonstrated, comparing humans affected by MC with dominant inheritance mode with recessive inheritance mode [47]. However, the present study is the first to compare the relative expression considering wild-type, heterozygous and homozygous individuals for the same mutation causing MC. The results demonstrated that the muscle tissue of the homozygous, heterozygotes and wild-types of animals, express the P8 product in similar levels. This result corroborates with that observed in humans [89] affected by MC with the dominant pattern.

Also, the results of the present study demonstrated that wild-type animals express a transcript without the nucleotides of exons 15 and 16. Although the alternative transcript X2 sequence (XM_021078562.1) was already available in the RefSeq database (NCBI) and was characterized by absences of exons 15 and 16, and thus similar to the transcript resulting from the deletion g.

NC_010460.4 of 6912538_6916702 described in myotonic pigs in the present study, it was not possible to state that if wild-type pigs for g. NC_010460.4 of 6912538_6916702 expressed this alternative transcript. Wild-type pigs express approximately 6% of the amount expressed by the affected pigs of this transcript without the exons 15 and 16. There is no description in any animal species of alternative splicing of the *CLCN1* gene without relation with MC, and, therefore, there is no study attributing function to an alternative transcript of *CLCN1*.

The existence of hybrids forming the *CLC1* channels, already been described related with MC in humans, due to the co-expression of distinct transcripts [7], [90]. It is possible that the translation occurs for this alternative transcript expressed in wild-type pigs. Protein expression studies could quantify this situation and also demonstrate its existence or not of an alternative isoform of *CLC1* as well the existence of *CLC1* heterodimers.

The present study did not evaluate the protein expression, nor the functionality of the mutant *CLC1* for g. NC_010460.4 del 6912538_6916702. However, it is expected that this mutation reduces by at least 70% the conductance to the ion CL⁻ since it is the minimum necessary for the occurrence of myotonia.

MATERIALS AND METHODS

SAMPLES

A family of 22 animals (G1), that had 9 animals affected by myotonia (A, B, C, D, E, O, P, U, V), was investigated. Samples collection and clinical evaluation were performed. Of affected animals, six was males and three was females. Four non-myotonic control animals (C1) were used for molecular comparison. Additionally, 150 control animals (C2) were used to validate the genotyping test. A physical examination was performed and only healthy animals were used, with the exception of those affected by myotonia.

Blood samples from all experimental animals were collected by the puncture of the auricular veins with 21G needles and stored in blood collection tubes with EDTA anticoagulant (BD Vacutainer®). Muscle samples were collected under general anesthesia by biopsies of m. gluteus medius of G1 and C1 animals. These muscle samples were frozen at -20 ° C for later extraction of DNA, maintained in RNAlater® and frozen at -20 ° C for RNA extraction, and maintained in 10% formaldehyde solution for the preparation of histological slides. The slides were processed for hematoxylin and eosin (H & E) and periodic-Schiff acid (PAS) staining. All procedures were approved by the Animal Use Ethics Committee (CEUA) of FMVZ-UNESP (protocol no. 169/2015).

EMG

Five affected animals (A-E) and two normal animals (1-2) were submitted to EMG. For this, concentric needle electrodes and 2-channel Neuromax 1000® equipment were used. The bandpass filter was adjusted at 10 to 10,000 Hz. Were evaluated the epaxial and proximal muscles of the four limbs, mainly m. gluteus medius, m. deltoid, m. triceps brachii and m. longuissimus dorsi.

MOLECULAR INVESTIGATION

The DNA was extracted from the muscle samples of the affected animals using the DNeasy® Blood & Tissue kit (Qiagen™), according to the protocol recommended by the manufacturer. Using whole blood samples, the DNA was extracted using the ReliaPrep™ Blood gDNA Miniprep System kit (Promega™) according to the manufacturer's recommended protocol. The total RNA was extracted using the RNeasy® Mini Kit (Qiagen™) and treated with RQ1 RNase-Free DNase® (Promega™, USA) following the manufacturer's recommendations. The reverse transcriptase (RT) reaction was prepared to a final volume of 60µl, using 800 ng of RNA, random primers and the enzyme ImProm-II® Reverse Transcription System (Promega, USA™) following the manufacturer's recommendations. Samples of extracted DNA, total RNA, and treated RNA were tested for relative purity and concentration by spectrophotometry using the NanoDrop® 2000 spectrophotometer (ThermoScientific™).

Primers were designed along reference sequence X1 (XM_021078561.1) in order to amplify the entire coding sequence of the *CLCN1* mRNA of pigs (supplementary material). RT-PCR reactions were prepared to a final volume of 25 µl, containing: 2 µl of cDNA (approximately 26 ng), 240 nM of each primer, 12.5 µl of the GoTaq® Green Master Mix (Promega, USA™) and water nuclease free qsp. The thermocycling conditions were adapted for each amplicon. The entire coding sequence of the *CLCN1* mRNA was obtained using samples from the affected pigs A, B, C, D, and E.

In order to amplify the region between intron 14 and 16, primers were designed (supplementary material). Conventional PCR reactions were for a final volume of 25 µl using 2 µl of DNA (approximately 0.4 µg), 0.4 µM of Forward primer, 0.4 µM of the first Reverse, 12.5 µl of the GoTaq® Green mix Master Mix (Promega, USA™) and water nuclease free qsp. Were used the DNA samples of same affected pigs A,B, C, D and E. All amplified products were analyzed by electrophoresis (Major Science™, Saratoga, CA, USA) on agarose gel (GelRed™ Biotium, Halward, CA, USA) and compared with molecular weight marker (LowRanger 100 bp DNA ladder®, HighRanger 1 Kb DNA ladder®, Norgen™, BioTek Corporation, Ontario, Canada). After confirmation of the specific size, each product was purified using the GenElute™ PCR Clean-Up Kit (Sigma-Aldrich®), following the manufacturer's recommendations.

The Sanger method were performed using the 3,500 Genetic Analyzers (Applied Biosystems). Sequencing reactions were prepared to a final volume of 10 μl containing 1.0 μl of the primer Forward or Reverse used in the PCR reaction at a concentration of 5 μM , 2 μl of the purified PCR product, 1.0 μl of the BigDye[®] Terminator v3.1 Cycle mix Sequencing Kit (Applied Biosystems[®]), 1.5 μl of BigDye[®] Terminator v1.1 & v3.1 5X Sequencing Buffer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) and nuclease-free qsp. Sequence alignment was performed using the Geneious[®] program version 10.2.3 (Biomatters, Auckland-New Zealand) (Kearse et al., 2012) considering the reference sequences of pig *CLCN1* gene gDNA NC_010460.3 and mRNA XM_021078561.1. The sequence X2 (XM_021078562.1) was also evaluated.

The genotyping test was performed by using three primers simultaneously in the same reaction (Table 4). PCR reactions were optimized to a final volume of 25 μl using 2 μl of DNA (approximately 0.4 μg), 240 nM of the forward oligonucleotide, 120 nM of each reverse oligonucleotide, 12.5 μl of the GoTaq[®] Green Master Mix (Promega, USA [™]) and water nuclease free qsp.

TABLE 4: Primers used in the development of the molecular test for diagnosis and genotyping of MC in pigs.

PRIMER	SEQUENCE 5'>3'	POSITION
Ftest1 (Forward)	TATGGCTTCCCCTGCATCTTT	Intron 14
Rtest1 (Reverse)	GTATGTGTAAGTACCCACT	Intron 14
Rtest2 (Reverse)	GGGTCCTTTGGGGGATGGA	Intron 17

To evaluate the relative expression of *CLCN1* gene [91], primers (supplementary material) were used for amplification of target P8 located in exon 8, P15-16 located between exons 15 and 16 and Beta-actin as the housekeeping gene (Table 2). Additionally were used the target P14 / 17, with a reverse primer located at the exon 14-17 boundary. Standards curve were performed for each target, were considered only reactions with efficiency 90 and 110% with at least 4 points. After validation of the reactions, cDNA samples of 3 wild-types, 3 heterozygous animals, and 3 homozygous recessive animals were used. Each qPCR reaction was performed in triplicate, including the negative control, with a final volume of 20 μl , containing 200nM of each primer oligonucleotide, 2 μl of cDNA (approximately 26ng), 10 μl of GoTaq[®] qPCR Master Mix (Applied Biosystems[™], USA) and water nuclease free qsp.

The 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems™, USA) was used, and the reaction conditions were: initial denaturation of 95 ° C for 10 minutes, followed by 40 cycles at 95 ° C for 15 seconds and 60 ° C per 60 seconds, and later performed the melting curve.

PROTEIN IN SILICO ANALYSIS

The *CLC1* protein sequence of wild-type and affected animals were predicted by using the Geneious® software version 10.2.3 (Biomatters, Auckland-New Zealand) program [92]. The protein sequences obtained were compared to the reference sequence X1 (XP_020934220.1), and the sequence X2 (XP_020934221.1) (RefSeq-NCBI) was also evaluated. The reference sequence of the isoform X1 (XP_020934220.1) of the pigs was also aligned with the reference sequence of the human isoform X1 (NP_000074), and with the *CLC1* sequence of another 15 different mammalian species, to verify conserved regions between species (Table 5).

TABLE 5: Identification of the sequences used for alignment of the *CLC1* protein from 15 mammalian species.

Sequence ID	Acess number Refseq - NCBI	Species	Protein isoform
1	NP_000074	Homo sapiens	X1
2	XP_020934220	Sus scrofa	X1
3	NP_001291956.1	Felis catus	-
4	NP_001003124.1	Canis lupus familiaris	-
5	NP_001277845.1	Bubalus bubalis	-
6	NP_038519.1	Mus musculus	-
7	NP_037279.1	Rattus norvegicus	-
8	XP_019814784.1	Bos indicus	X1
9	XP_016813811.1	Pan troglodytes	X1
10	XP_013819008.1	Capra hircus	X1
11	XP_004008185.3	Ovis aries	X1
12	XP_001915671.2	Equus caballus	-
13	XP_017527433.1	Manis javanica	-
14	XP_012877091.1	Dipodomys ordii	-
15	XP_004474189.1	Dasypus novemcinctus	-

The structure of the pig *CLC1* of wild-type animals was modeled using the consensus mRNA sequence of the wild-type animals (*CLC1*-WT) and affected animals (*CLC1*-MC). For this, the Swiss-Model® software (Biasini et al., 2014) and the structural model of the bovine CLC-K chlorine channel (PDB ID: 5TQQ) were used. The final structure was validated for the values of quality similarity with native protein (Z-Scores) using the ProSa-web tool [93]. After validation, the generated structure was submitted to the software Swiss-PDB Viewer 4.1.0 for manual optimization, according to the model used [94].

REFERENCES

- [1] I. Nonaka and E. Satoyoshi, “Myotonic disorders,” in *Skeletal Muscle Pathology*, F. L. Mastaglia and J. N. Walton, Eds. Universidade de Michigan: Churchill Livingstone, 1992, pp. 319–342.
- [2] R. L. BARCHI, “The pathophysiology of excitation in skeletal muscle,” in *Disorders of voluntary muscle*, J. . K. WALTON G.; HILTON-JONES, D., Ed. Edinburgh: Churchill Livingstone, 1994, pp. 415–436.
- [3] P. T. PALADE and R. L. BARCHI, “Characteristics of the chloride conductance in muscle fibers of the rat diaphragm,” *J. Gen. Physiol.*, vol. 69, no. 3, pp. 325–342, Mar. 1977.
- [4] A. H. Bretag, *Muscle chloride channels*, vol. 67, no. 2. 1987.
- [5] E. P. Hoffman, “Voltage-gated ion channelopathies: inherited disorders caused by abnormal sodium, chloride, and calcium regulation in skeletal muscle,” *Annu Rev Med*, vol. 46, pp. 431–441, 1995.
- [6] S. C. Brown and C. Jimenez-Mallebera, “Biochemical and molecular basis of muscle disease,” in *Disorders of Voluntary Muscle*, G. Karpati, D. Hilton-Jones, K. Bushby, and R. C. Griggs, Eds. Cambridge University Press, 2010.
- [7] M.-J. Lin, T.-H. You, H. Pan, and K.-M. Hsiao, “Functional characterization of CLCN1 mutations in Taiwanese patients with myotonia congenita via heterologous expression,” *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 351, no. 4, pp. 1043–1047, Dec. 2006.
- [8] G. Ulzi *et al.*, “Myotonia congenita: novel mutations in CLCN1 gene and functional characterizations in Italian patients,” *J Neurol Sci*, vol. 318,

- no. 1–2, pp. 65–71, 2012.
- [9] C. L. Beck, C. Fahlke, and A. L. George Jr., “Molecular basis for decreased muscle chloride conductance in the myotonic goat,” *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 93, no. 20, pp. 11248–11252, 1996.
- [10] R. Dutzler, E. B. Campbell, M. Cadene, B. T. Chait, and R. MacKinnon, “X-ray structure of a ClC chloride channel at 3.0 Å reveals the molecular basis of anion selectivity,” *Nature*, vol. 415, no. 6869, pp. 287–294, 2002.
- [11] T. J. Jentsch, K. Steinmeyer, and G. Schwarz, “Primary structure of *Torpedo marmorata* chloride channel isolated by expression cloning in *Xenopus oocytes*,” *Nature*, vol. 348, no. 6301, pp. 510–514, Dec. 1990.
- [12] F. Lehmann-Horn and K. Jurkat-Rott, “Voltage-gated ion channels and hereditary disease,” *Physiol Rev*, vol. 79, no. 4, pp. 1317–1372, 1999.
- [13] N. A. O’Leary *et al.*, “Reference sequence (RefSeq) database at NCBI: current status, taxonomic expansion, and functional annotation,” *Nucleic Acids Res.*, vol. 44, no. D1, pp. D733–45, Jan. 2016.
- [14] M. Louet *et al.*, “In silico model of the human ClC-Kb chloride channel: pore mapping, biostructural pathology and drug screening,” *Sci. Rep.*, vol. 7, no. 1, p. 7249, 2017.
- [15] L. Ma, G. Y. Rychkov, E. A. Bykova, J. Zheng, and A. H. Bretag, “Movement of hClC-1 C-termini during common gating and limits on their cytoplasmic location,” *Biochem. J.*, vol. 436, no. 2, pp. 415–428, Jun. 2011.
- [16] L. Feng, E. B. Campbell, Y. Hsiung, and R. MacKinnon, “Structure of a eukaryotic CLC transporter defines an intermediate state in the transport cycle,” *Science*, vol. 330, no. 6004, pp. 635–641, Oct. 2010.
- [17] E. Park, E. B. Campbell, and R. MacKinnon, “Structure of a CLC chloride ion channel by cryo-electron microscopy,” *Nature*, vol. 541, no. 7638, pp. 500–505, Jan. 2017.
- [18] HGDM, “Human Gene Mutation Database,” 2017. [Online]. Available: <http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/index.php>. [Accessed: 01-Nov-2017].
- [19] K. Steinmeyer *et al.*, “Inactivation of muscle chloride channel by transposon insertion in myotonic mice,” *Nature*, vol. 354, no. 6351, pp. 304–308, 1991.
- [20] T. H. Rhodes, C. H. Vite, U. Giger, D. F. Patterson, C. Fahlke, and A. L.

- George Jr, "A missense mutation in canine CLC-1 causes recessive myotonia congenita in the dog1," *FEBS Lett.*, vol. 456, no. 1, pp. 54–58, 1999.
- [21] D. F. Finnigan, W. J. Hanna, R. Poma, and A. J. Bendall, "A novel mutation of the CLCN1 gene associated with myotonia hereditaria in an Australian cattle dog," *J Vet Intern Med*, vol. 21, no. 3, pp. 458–463, 2007.
- [22] I. D. Wijnberg *et al.*, "A missense mutation in the skeletal muscle chloride channel 1 (CLCN1) as candidate causal mutation for congenital myotonia in a New Forest pony," *Neuromuscul Disord*, vol. 22, no. 4, pp. 361–367, 2012.
- [23] A. S. Borges *et al.*, "Clinical and molecular study of a new form of hereditary myotonia in Murrah water buffalo," *Neuromuscul Disord*, vol. 23, no. 3, pp. 206–213, 2013.
- [24] B. Gandolfi *et al.*, "A Novel Mutation in CLCN1 Associated with Feline Myotonia Congenita," *PLoS One*, vol. 9, no. 10, p. e109926, 2014.
- [25] W. Cheng, J. Tian, J. M. Burgunder, W. Hunziker, and H. L. Eng, "Myotonia congenita-associated mutations in chloride channel-1 affect zebrafish body wave swimming kinematics," *PLoS One*, vol. 9, no. 8, p. e103445, 2014.
- [26] L. V Monteagudo, M. T. Tejedor, J. J. Ramos, D. Lacasta, and L. M. Ferrer, "Ovine congenital myotonia associated with a mutation in the muscle chloride channel gene," *Vet J*, vol. 204, no. 1, pp. 128–129, 2015.
- [27] R. Brugnoli, S. Galantini, P. Confalonieri, M. R. Balestrini, F. Cornelio, and R. Mantegazza, "Identification of three novel mutations in the major human skeletal muscle chloride channel gene (CLCN1), causing myotonia congenita," *Hum Mutat*, vol. 14, no. 5, p. 447, 1999.
- [28] C. De Diego *et al.*, "Novel mutations in the muscle chloride channel CLCN1 gene causing myotonia congenita in Spanish families," *J. Neurol.*, vol. 246, no. 9, pp. 825–829, 1999.
- [29] I. S. Moon *et al.*, "Novel CLCN1 mutations and clinical features of Korean patients with myotonia congenita," *J Korean Med Sci*, vol. 24, no. 6, pp. 1038–1044, 2009.
- [30] F. F. Wu *et al.*, "Novel CLCN1 mutations with unique clinical and electrophysiological consequences," *Brain*, vol. 125, no. Pt 11, pp. 2392–

- 2407, 2002.
- [31] J.-M. Burgunder *et al.*, “Novel chloride channel mutations leading to mild myotonia among Chinese.,” *Neuromuscul. Disord.*, vol. 18, no. 8, pp. 633–640, Aug. 2008.
- [32] M. Pusch, “Myotonia caused by mutations in the muscle chloride channel gene CLCN1.,” *Hum. Mutat.*, vol. 19, no. 4, pp. 423–434, Apr. 2002.
- [33] S. Portaro *et al.*, “Clinical, Molecular, and Functional Characterization of CLCN1 Mutations in Three Families with Recessive Myotonia Congenita,” *Neuromolecular Med*, 2015.
- [34] A. J. F. Griffiths, S. R. Wessler, S. B. Carroll, and J. Doebley, *Introdução à genética*, 11th ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2016.
- [35] M. C. Koch *et al.*, “The skeletal muscle chloride channel in dominant and recessive human myotonia,” *Science (80-.)*, vol. 257, no. 5071, pp. 797–800, 1992.
- [36] a L. George, M. a Crackower, J. a Abdalla, a J. Hudson, and G. C. Ebers, “Molecular basis of Thomsen’s disease (autosomal dominant myotonia congenita).,” *Nat. Genet.*, vol. 3, no. 4, pp. 305–310, 1993.
- [37] C. Kubisch, T. Schmidt-Rose, B. Fontaine, A. H. Bretag, and T. J. Jentsch, “ClC-1 Chloride Channel Mutations in Myotonia Congenita: Variable Penetrance of Mutations Shifting the Voltage Dependence,” *Hum. Mol. Genet.*, vol. 7, no. 11, pp. 1753–1760, Oct. 1998.
- [38] L. Chen *et al.*, “Exon 17 skipping in CLCN1 leads to recessive myotonia congenita.,” *Muscle Nerve*, vol. 29, no. 5, pp. 670–676, May 2004.
- [39] I. D. Wijnberg *et al.*, “A missense mutation in the skeletal muscle chloride channel 1 (CLCN1) as candidate causal mutation for congenital myotonia in a New Forest pony,” *Neuromuscul. Disord.*, vol. 22, no. 4, pp. 361–367, 2012.
- [40] S. H. Bryant, “Cable properties of external intercostal muscle fibres from myotonic and nonmyotonic goats.,” *J. Physiol.*, vol. 204, no. 3, pp. 539–50, 1969.
- [41] R. J. Barohn, M. M. Dimachkie, and C. E. Jackson, “A PATTERN RECOGNITION APPROACH TO THE PATIENT WITH A SUSPECTED MYOPATHY,” *Neurol. Clin.*, vol. 32, no. 3, p. 569–vii, Aug. 2014.
- [42] M. Duffield, G. Rychkov, A. Bretag, and M. Roberts, “Involvement of Helices at the Dimer Interface in ClC-1 Common Gating,” *J. Gen.*

- Physiol.*, vol. 121, no. 2, pp. 149–161, Feb. 2003.
- [43] D. Feza *et al.*, “Transient weakness and compound muscle action potential decrement in myotonia congenita,” *Muscle Nerve*, vol. 21, no. 10, pp. 1334–1337, 1998.
- [44] E. Colding-Jorgensen, M. DunO, M. Schwartz, and J. Vissing, “Decrement of compound muscle action potential is related to mutation type in myotonia congenita.,” *Muscle Nerve*, vol. 27, no. 4, pp. 449–455, Apr. 2003.
- [45] J. Thomsen, “Tönische Krämpfe in willkürlich beweglichen Muskeln in Folge von ererbter psychischer,” *Arch. Psychiatr. Nervenkrankheiten*, no. 6, pp. 702–718, 1876.
- [46] P. E. Becker, “Myotonia congenita and syndromes associated with myotonia,” *Stuttgart: Thieme*, 1977.
- [47] M. Duno, E. Colding-Jorgensen, M. Grunnet, T. Jespersen, J. Vissing, and M. Schwartz, “Difference in allelic expression of the CLCN1 gene and the possible influence on the myotonia congenita phenotype.,” *Eur. J. Hum. Genet.*, vol. 12, no. 9, pp. 738–743, Sep. 2004.
- [48] A. Michell, *Understanding EMG*. OUP Oxford, 2013.
- [49] J. Kimura, *Electrodiagnosis in diseases of nerve and muscle*. Philadelphia, 1989.
- [50] D. Preston and B. Shapiro, *Electromyography and neuromuscular disorders*. Boston, 1998.
- [51] A. L. Goldberg and R. E. Wittes, “Genetic code: aspects of organization.,” *Science*, vol. 153, no. 3734, pp. 420–424, Jul. 1966.
- [52] F. Castro-Chavez, “The rules of variation: Amino acid exchange according to the rotating circular genetic code,” *J. Theor. Biol.*, vol. 264, no. 3, pp. 711–721, Jun. 2010.
- [53] C. Dehainault *et al.*, “A deep intronic mutation in the RB1 gene leads to intronic sequence exonisation.,” *Eur. J. Hum. Genet.*, vol. 15, no. 4, pp. 473–477, Apr. 2007.
- [54] K. S. Cunha *et al.*, “Hybridization Capture-Based Next-Generation Sequencing to Evaluate Coding Sequence and Deep Intronic Mutations in the NF1 Gene,” *Genes (Basel)*, vol. 7, no. 12, p. 133, Dec. 2016.
- [55] R. Vaz-Drago, N. Custodio, and M. Carmo-Fonseca, “Deep intronic mutations and human disease.,” *Hum. Genet.*, vol. 136, no. 9, pp. 1093–

- 1111, Sep. 2017.
- [56] H. Gonorazky *et al.*, “RNAseq analysis for the diagnosis of muscular dystrophy,” *Ann. Clin. Transl. Neurol.*, vol. 3, no. 1, pp. 55–60, Jan. 2016.
- [57] C. Bérout *et al.*, “Dystrophinopathy caused by mid-intronic substitutions activating cryptic exons in the DMD gene,” *Neuromuscul. Disord.*, vol. 14, no. 1, pp. 10–18, Apr. 2018.
- [58] J. D. Brook *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*, vol. 68, no. 4, pp. 799–808, Feb. 1992.
- [59] L. P. Ranum, P. F. Rasmussen, K. A. Benzow, M. D. Koob, and J. W. Day, “Genetic mapping of a second myotonic dystrophy locus.,” *Nat. Genet.*, vol. 19, no. 2, pp. 196–198, Jun. 1998.
- [60] D. L. Raja Rayan *et al.*, “A new explanation for recessive myotonia congenital: Exon deletions and duplications in CLCN1,” *Neurology*, vol. 78, no. 24, pp. 1953–1958, 2012.
- [61] I. D. Wijnberg *et al.*, “A missense mutation in the skeletal muscle chloride channel 1 (CLCN1) as candidate causal mutation for congenital myotonia in a New Forest pony,” *Neuromuscul. Disord.*, vol. 22, no. 4, pp. 361–367, 2012.
- [62] F. Lehmann-Horn, V. Mailander, R. Heine, and A. L. George, “Myotonia levior is a chloride channel disorder.,” *Hum. Mol. Genet.*, vol. 4, no. 8, pp. 1397–1402, Aug. 1995.
- [63] N. Katsumata *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.,” *Hum. Mutat.*, vol. 11, no. 4, p. 331, 1998.
- [64] X.-L. Liu *et al.*, “Myotonia congenita: novel mutations in CLCN1 gene,” *Channels*, vol. 9, no. 5, pp. 292–298, Aug. 2015.
- [65] T. Stauber, S. Weinert, and T. J. Jentsch, “Cell biology and physiology of CLC chloride channels and transporters.,” *Compr. Physiol.*, vol. 2, no. 3, pp. 1701–1744, Jul. 2012.
- [66] M. Olivella, A. Gonzalez, L. Pardo, and X. Deupi, “Relation between sequence and structure in membrane proteins.,” *Bioinformatics*, vol. 29,

- no. 13, pp. 1589–1592, Jul. 2013.
- [67] R. Dutzler, E. B. Campbell, M. Cadene, B. T. Chait, and R. MacKinnon, “X-ray structure of a ClC chloride channel at 3.0 Å reveals the molecular basis of anion selectivity,” *Nature*, vol. 415, no. 6869, pp. 287–294, Jan. 2002.
- [68] R. Dutzler, E. B. Campbell, and R. MacKinnon, “Gating the selectivity filter in ClC chloride channels,” *Science (80-.)*, vol. 300, no. 5616, pp. 108–112, 2003.
- [69] H. Jayaram, J. L. Robertson, F. Wu, C. Williams, and C. Miller, “Structure of a Slow CLC Cl⁻/H⁺ Antiporter from a Cyanobacterium,” *Biochemistry*, vol. 50, no. 5, pp. 788–794, Feb. 2011.
- [70] H.-H. Lim, R. B. Stockbridge, and C. Miller, “Fluoride-dependent interruption of the transport cycle of a CLC Cl⁻/H⁺ antiporter,” *Nat. Chem. Biol.*, vol. 9, p. 721, Sep. 2013.
- [71] A. Bateman, “The structure of a domain common to archaebacteria and the homocystinuria disease protein,” *Trends Biochem. Sci.*, vol. 22, no. 1, pp. 12–13, Jan. 1997.
- [72] B. Bennetts *et al.*, “Cytoplasmic ATP-sensing domains regulate gating of skeletal muscle ClC-1 chloride channels,” *J. Biol. Chem.*, vol. 280, no. 37, pp. 32452–32458, Sep. 2005.
- [73] B. Bennetts, M. W. Parker, and B. A. Cromer, “Inhibition of skeletal muscle ClC-1 chloride channels by low intracellular pH and ATP,” *J. Biol. Chem.*, vol. 282, no. 45, pp. 32780–32791, Nov. 2007.
- [74] B. Bennetts, Y. Yu, T.-Y. Chen, and M. W. Parker, “Intracellular β-Nicotinamide Adenine Dinucleotide Inhibits the Skeletal Muscle ClC-1 Chloride Channel,” *J. Biol. Chem.*, vol. 287, no. 31, pp. 25808–25820, Jul. 2012.
- [75] P.-Y. Tseng, B. Bennetts, and T.-Y. Chen, “Cytoplasmic ATP Inhibition of CLC-1 Is Enhanced by Low pH,” *J. Gen. Physiol.*, vol. 130, no. 2, pp. 217–221, Aug. 2007.
- [76] R. Sasaki *et al.*, “Novel chloride channel gene mutations in two unrelated Japanese families with Becker’s autosomal recessive generalized myotonia,” *Neuromuscul. Disord.*, vol. 9, no. 8, pp. 587–592, Dec. 1999.
- [77] E. T. Wang *et al.*, “Alternative isoform regulation in human tissue transcriptomes,” *Nature*, vol. 456, no. 7221, pp. 470–476, Nov. 2008.

- [78] Q. Pan, O. Shai, L. J. Lee, B. J. Frey, and B. J. Blencowe, "Deep surveying of alternative splicing complexity in the human transcriptome by high-throughput sequencing," *Nat. Genet.*, vol. 40, p. 1413, Nov. 2008.
- [79] L. Ferrera *et al.*, "Regulation of TMEM16A Chloride Channel Properties by Alternative Splicing," *J. Biol. Chem.*, vol. 284, no. 48, pp. 33360–33368, Nov. 2009.
- [80] S. Ponissery Saidu, A. B. Stephan, A. K. Talaga, H. Zhao, and J. Reiser, "Channel properties of the splicing isoforms of the olfactory calcium-activated chloride channel Anoctamin 2," *J. Gen. Physiol.*, vol. 141, no. 6, p. 691 LP-703, Jun. 2013.
- [81] T. Ogura *et al.*, "ClC-3B, a novel ClC-3 splicing variant that interacts with EBP50 and facilitates expression of CFTR-regulated ORCC.," *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.*, vol. 16, no. 8, pp. 863–865, Jun. 2002.
- [82] K. Shimada, X. Li, G. Xu, D. E. Nowak, L. A. Showalter, and S. A. Weinman, "Expression and canalicular localization of two isoforms of the ClC-3 chloride channel from rat hepatocytes," *Am. J. Physiol. Liver Physiol.*, vol. 279, no. 2, pp. G268–G276, Aug. 2000.
- [83] S. Chu, C. B. Murray, M. M. Liu, and P. L. Zeitlin, "A short ClC-2 mRNA transcript is produced by exon skipping.," *Nucleic Acids Res.*, vol. 24, no. 17, pp. 3453–3457, Sep. 1996.
- [84] S. Chu and P. L. Zeitlin, "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 Res.*, vol. 25, no. 20, pp. 4153–4159, Oct. 1997.
- [85] M. E. Loewen, D. W. MacDonald, K. J. Gaspar, and G. W. Forsyth, "Isoform-specific exon skipping in a variant form of ClC-2," *Biochim. Biophys. Acta - Gene Struct. Expr.*, vol. 1493, no. 1, pp. 284–288, 2000.
- [86] J. Eggermont *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.," *Biochem. J.*, vol. 325, no. Pt 1, pp. 269–276, Jul. 1997.
- [87] M. Forino, R. Graziotto, E. Tosetto, G. Gambaro, A. D'Angelo, and F. Anglani, "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," *J. Hum. Genet.*, vol. 49, no. 1, pp. 53–60,

- 2004.
- [88] N. Charlet-B, R. S. Savkur, G. Singh, A. V Philips, E. A. Grice, and T. A. Cooper, "Loss of the muscle-specific chloride channel in type 1 myotonic dystrophy due to misregulated alternative splicing.," *Mol. Cell*, vol. 10, no. 1, pp. 45–53, Jul. 2002.
- [89] P. Imbrici *et al.*, "Multidisciplinary study of a new CLC-1 mutation causing myotonia congenita: a paradigm to understand and treat ion channelopathies.," *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.*, vol. 30, no. 10, pp. 3285–3295, Oct. 2016.
- [90] B. J. Simpson *et al.*, "Characterization of three myotonia-associated mutations of the CLCN1 chloride channel gene via heterologous expression.," *Hum. Mutat.*, vol. 24, no. 2, p. 185, Aug. 2004.
- [91] K. J. Livak and T. D. Schmittgen, "Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method.," *Methods*, vol. 25, no. 4, pp. 402–408, Dec. 2001.
- [92] M. Kearse *et al.*, "Geneious Basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data.," *Bioinformatics*, vol. 28, pp. 1647–1649, 2012.
- [93] M. Wiederstein and M. J. Sippl, "ProSA-web: interactive web service for the recognition of errors in three-dimensional structures of proteins.," *Nucleic Acids Res.*, vol. 35, no. suppl_2, pp. W407–W410, Jul. 2007.
- [94] N. Guex and M. C. Peitsch, "SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: an environment for comparative protein modeling.," *Electrophoresis*, vol. 18, no. 15, pp. 2714–2723, Dec. 1997.

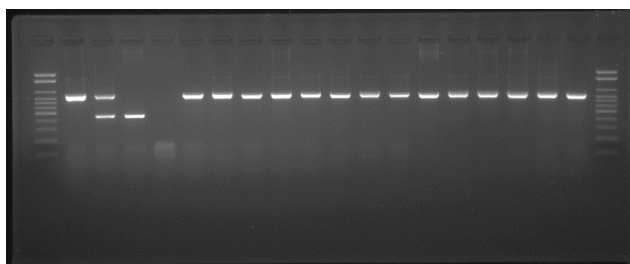
SUPPLEMENTARY MATERIALS

1 – Characteristic diver bomb sound produced by the loudspeaker during EMG of affected animals.

2 – Hematoxilin & eosin staining of muscular tissue of affected animals.

3- TABLE 1: Polymorphisms, insertion and deletion found in the DNA sequences of the affected animals in relation to the genomic reference sequence for the swine *CLCN1* gene (NC_010460.4).

Nucleotide in sequences of myotonic animals	Reference NC_010460.4	Position from ATG	Intron
G	A	22638	14
G	T	22663	14
G	A	22688	14
G	A	22713	14
C	T	22737	14
G	A	22781	14
A	G	22785	14
C	T	22786	14
T	A	22866	14
G	C	22983	14
A	G	22985	14
T	C	23084	14
C	T	23093	14
T	G	23196	14
T	C	23199	14
C	T	23223	14
G	T	23383	14
G	A	23414	14
G	A	23435	14
A	G	23469	14
INS ATCG	-	23616	14
G	A	23635	14
A	T	23655	14
A	C	27827	16
A	T	27829	16
T	A	27830	16
G	C	27831	16
G	A	27832	16
G	C	27833	16
T	C	27834	16
T	A	27835	16
T	C	27836	16
A	G	27838	16
A	G	27930	16
A	G	27933	16
A	G	27935	16
G	T	28113	16
DEL 6413_6473	-	28130	16-17
C	A	28209	16
A	C	28248	16
C	T	28252	16
Y	T	28319	16
M	C	28320	16
A	G	28322	16
A	G	28336	16



4 - FIGURE 1: 1.5% agarose gel electrophoresis for diagnostic testing of congenital myotonia in swine. Wells 1 and 20: molecular weight marker. Well 2- control for wild type result. Well 3 - control for heterozygous result. Well 4 - control for homozygous recessive result. Well 5 - negative reaction control. Wells 6 to 19 - probands with homozygous wild types.

5 TABLE 2 Δ CT mean values of P8 and respective values of standard deviation.

Genotype	P8 CT mean	P8 CT SD	CT mean B actin	CT-SD B actin	Δ CT	Δ CT mean	Δ CT SD
wild type 1	23,169	0,085	14,209	0,243	8,96		
wild type 2	22,962	0,184	13,844	0,048	9,118	9,526	0,847
wild type 3	24,47	0,154	13,97	0,109	10,5		
Heterozygous H	23,871	0,238	14,343	0,179	9,528		
Heterozygous K	24,274	0,318	13,9	0,151	10,374	9,677	0,635
Heterozygous Q	23,42	0,009	14,29	0,093	9,13		
Homozygous O	24,588	0,003	15,985	0,297	8,603		
Homozygous P	23,481	0,079	14,589	0,144	8,892	9,318	0,999
Homozygous V	24,849	0,258	14,388	0,178	10,461		

CT SD- standard deviation for CT values relative to the triplicate of each sample. P8 – amplicon inside the exon 8 of *CLCN1* gene. B actin – housekeeping gene.

6 TABLE 3: Δ CT mean values of P15-16 and respective values of standard deviation.

Genotype	P15-16 CT mean	P15-16 CT SD	CT mean B actin	CT-SD B actin	Δ CT	Δ CT mean	Δ CT SD
wild type 1	22,064	0,239	14,209	0,243	7,855		
wild type 2	22,125	0,284	13,844	0,048	8,281	8,455	0,703
wild type 3	23,199	0,203	13,97	0,109	9,229		
Heterozygous H	23,72	0,053	14,343	0,179	9,377		
Heterozygous K	22,935	0,104	13,9	0,151	9,035	8,93	0,506
Heterozygous Q	22,67	0,064	14,29	0,093	8,38		
Homozygous O	-	-	15,985	0,297	-		
Homozygous P	-	-	14,589	0,144	-	-	-
Homozygous V	-	-	14,388	0,178	-		

CT SD- standard deviation for CT values relative to the triplicate of each sample. P15-16 – amplicon between the exons 15 and 16 of *CLCN1* gene. B actin – housekeeping gene. - amplification was not detected.

7 TABLE 4: Δ CT mean values of P14/17 and respective values of standard deviation.

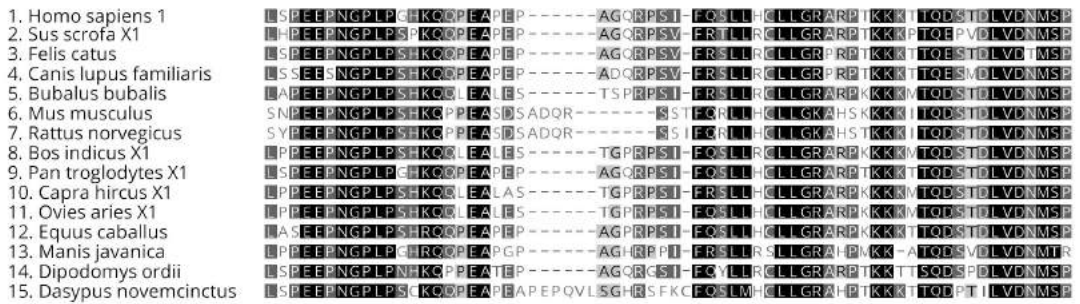
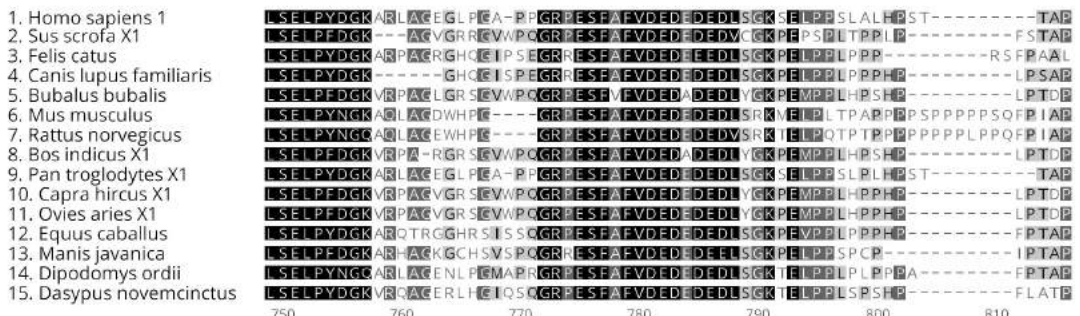
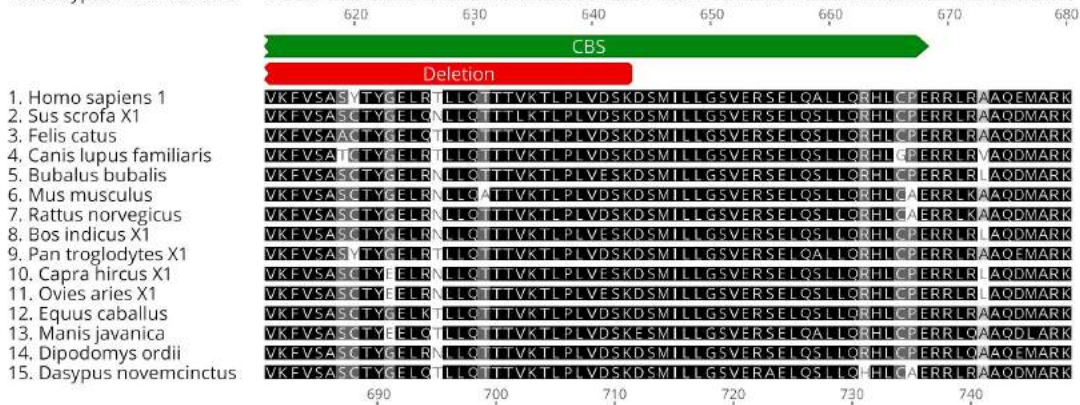
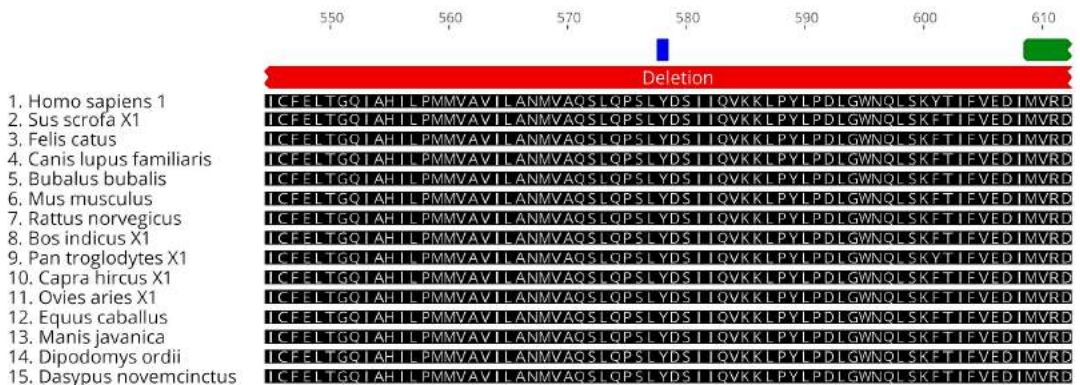
Genotype	P14/17 CT mean	P15-16 CT SD	CT mean B actin	CT-SD B actin	Δ CT	Δ CT mean	Δ CT SD
wild type 1	30,036	0,161	13,916	0,108	16,120		
wild type 2	29,774	0,351	14,002	0,121	15,772	15,814	0,286
wild type 3	30,500	0,261	14,948	0,055	15,552		
Heterozygous H	27,497	0,172	14,940	0,148	12,557		
Heterozygous K	27,341	0,029	14,923	0,051	12,418	12,578	0,171
Heterozygous Q	27,918	0,061	15,159	0,104	12,759		
Homozygous O	27,415	0,163	15,630	0,08	11,785		
Homozygous P	26,189	0,04	14,339	0,111	11,850	11,838	0,048
Homozygous V	27,074	0,263	15,195	0,049	11,879		

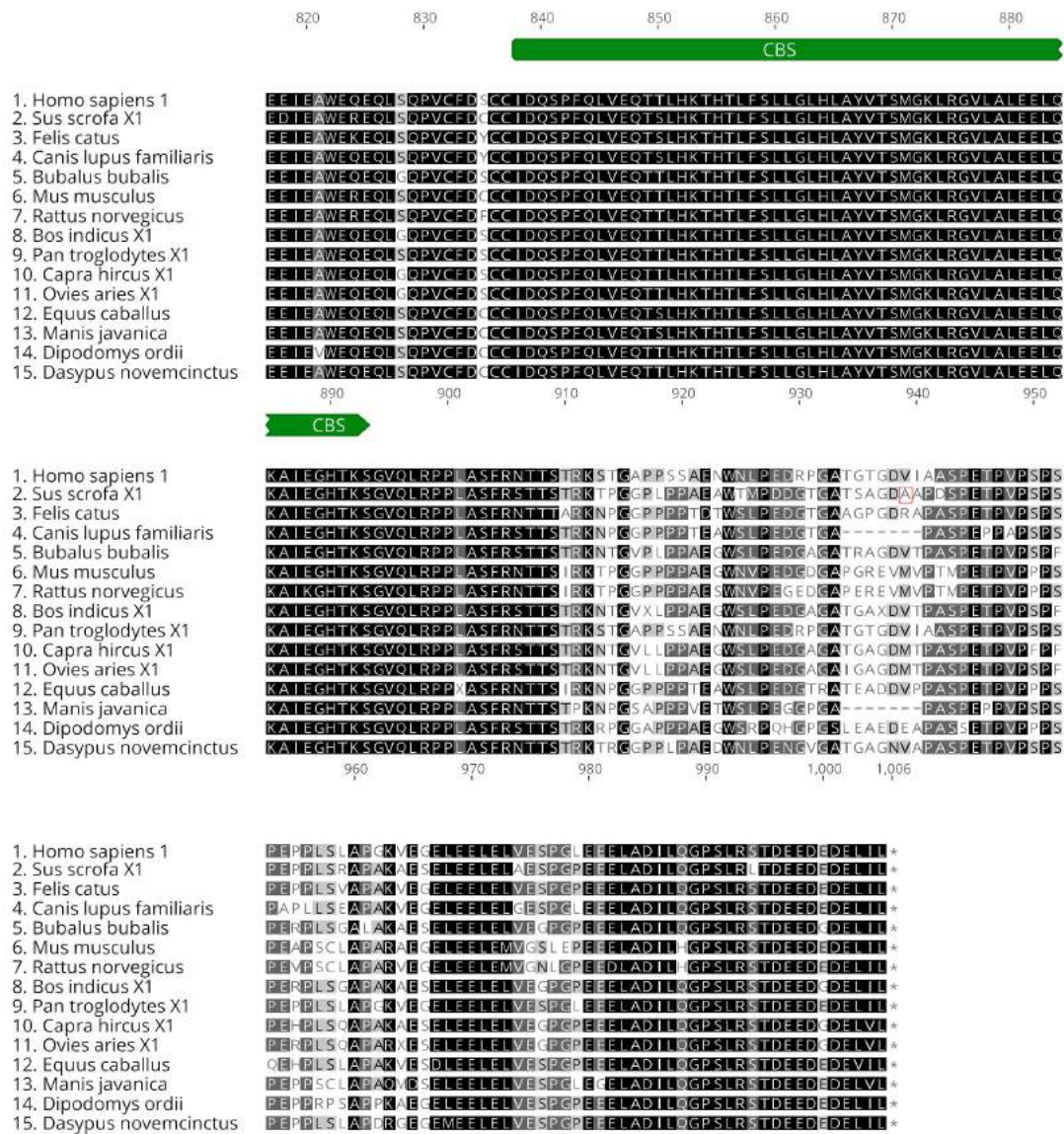
CT SD- standard deviation for CT values relative to the triplicate of each sample.
P14/17 – amplicon at the exons 14-17 boundary of *CLCN1* gene. B actin – housekeeping gene. - amplification was not detected.

	1	10	20	30	40	50	60															
1. Homo sapiens 1	ME	SR	SDRRGG	ES	SWWGS	AP	QYQYMP	FE	HCTSYGLP	SE	NGGL	CHR	LR	RD	DAGRR	NA	HP	TO	YGH	HK	ER	
2. Sus scrofa X1	ME	SR	SDRRRR	ES	SWWGS	AP	QYQYMP	FE	HCTSYGLP	SE	NGGL	CHR	LR	RD	DAGRR	NA	HP	TO	YGH	HK	ER	
3. Felis catus	ME	SR	SDRRGG	ES	SWWGS	AP	QYQYMP	FE	HCTSYGLP	SE	NGGL	CHR	LR	RD	DAGRR	NA	HP	TO	YGH	HK	ER	
4. Canis lupus familiaris	MQ	SR	OSLR	RRGG	ES	SWWGS	AP	QYQYMP	FE	HCTSYGLP	SE	NGGL	CHR	LR	RD	DAGRR	NA	HP	TO	YGH	HK	ER
5. Bubalus bubalis	ME	SR	SDRRGG	ES	SWWGS	AP	QYQYMP	FE	HCTSYGLP	SE	NGGL	CHR	LR	RD	DAGRR	NA	HP	TO	YGH	HK	ER	
6. Mus musculus	ME	SR	SDRRGG	ES	SWWGS	AP	QYQYMP	FE	HCTSYGLP	SE	NGGL	CHR	LR	RD	DAGRR	NA	HP	TO	YGH	HK	ER	
7. Rattus norvegicus	ME	SR	SDRRGG	ES	SWWGS	AP	QYQYMP	FE	HCTSYGLP	SE	NGGL	CHR	LR	RD	DAGRR	NA	HP	TO	YGH	HK	ER	
8. Bos indicus X1	ME	SR	SDRRGG	ES	SWWGS	AP	QYQYMP	FE	HCTSYGLP	SE	NGGL	CHR	LR	RD	DAGRR	NA	HP	TO	YGH	HK	ER	
9. Pan troglodytes X1	ME	SR	SDRRGG	ES	SWWGS	AP	QYQYMP	FE	HCTSYGLP	SE	NGGL	CHR	LR	RD	DAGRR	NA	HP	TO	YGH	HK	ER	
10. Capra hircus X1	ME	SR	SDRRGG	ES	SWWGS	AP	QYQYMP	FE	HCTSYGLP	SE	NGGL	CHR	LR	RD	DAGRR	NA	HP	TO	YGH	HK	ER	
11. Ovis aries X1	ME	SR	SDRRGG	ES	SWWGS	AP	QYQYMP	FE	HCTSYGLP	SE	NGGL	CHR	LR	RD	DAGRR	NA	HP	TO	YGH	HK	ER	
12. Equus caballus	ME	SR	SDRRGG	ES	SWWGS	AP	QYQYMP	FE	HCTSYGLP	SE	NGGL	CHR	LR	RD	DAGRR	NA	HP	TO	YGH	HK	ER	
13. Manis javanica	ME	SR	SDRRGG	ES	SWWGS	AP	QYQYMP	FE	HCTSYGLP	SE	NGGL	CHR	LR	RD	DAGRR	NA	HP	TO	YGH	HK	ER	
14. Dipodomys ordii	ME	SR	SDRRGG	ES	SWWGS	AP	QYQYMP	FE	HCTSYGLP	SE	NGGL	CHR	LR	RD	DAGRR	NA	HP	TO	YGH	HK	ER	
15. Dasyus novemcinctus	ME	SR	SDRRGG	ES	SWWGS	AP	QYQYMP	FE	HCTSYGLP	SE	NGGL	CHR	LR	RD	DAGRR	NA	HP	TO	YGH	HK	ER	

	70	80	90	100	110	120	130																																																						
1. Homo sapiens 1	ES	DR	ED	IG	MP	PK	TG	SS	TV	DS	KD	ED	H	Y	SK	CD	C	I	H	R	L	E	Q	V	V	R	R	K	L	G	E	D	W	I	F	L	V	L	L	G	L	M	A	L	V	S	W	S	M	P											
2. Sus scrofa X1	ES	DR	ED	IG	MP	PK	TG	SS	TV	DS	KD	ED	H	Y	SK	CD	C	I	H	R	M	E	L	Q	V	V	R	R	K	L	G	E	D	W	I	F	L	V	L	L	G	L	M	A	L	V	S	W	S	M	P										
3. Felis catus	P	P	H	R	E	Q	G	M	G	M	P	K	T	G	S	S	T	D	S	K	D	E	D	H	S	K	C	D	C	M	R	L	E	Q	V	V	R	R	K	L	G	E	D	W	I	F	L	V	L	L	G	L	M	A	L	V	S	W	S	M	P
4. Canis lupus familiaris	ES	DR	ED	IG	MP	PK	TG	SS	TV	DS	KD	ED	H	Y	SK	CD	C	I	H	R	L	E	Q	V	V	R	R	K	L	G	E	D	W	I	F	L	V	L	L	G	L	M	A	L	V	S	W	S	M	P											
5. Bubalus bubalis	ES	DR	ED	IG	MP	PK	TG	SS	TV	DS	KD	ED	H	Y	SK	CD	C	I	H	R	L	E	Q	V	V	R	R	K	L	G	E	D	W	I	F	L	V	L	L	G	L	M	A	L	V	S	W	S	M	P											
6. Mus musculus	YS	Y	A	Q	D	G	G	M	P	K	K	M	G	S	S	T	M	D	S	L	D	E	D	H	Y	SK	CD	C	V	H	R	L	E	Q	V	V	R	R	K	L	G	E	D	W	I	F	L	V	L	L	G	L	M	A	L	V	S	W	S	M	P
7. Rattus norvegicus	YS	Y	A	Q	D	R	G	I	P	K	T	D	S	S	T	V	D	S	L	D	E	D	H	Y	SK	CD	C	V	H	R	L	E	Q	V	V	R	R	K	L	G	E	D	W	I	F	L	V	L	L	G	L	M	A	L	V	S	W	S	M	P	
8. Bos indicus X1	ES	DR	ED	IG	MP	PK	TG	SS	TV	DS	KD	ED	H	Y	SK	CD	C	I	H	R	L	E	Q	V	V	R	R	K	L	G	E	D	W	I	F	L	V	L	L	G	L	M	A	L	V	S	W	S	M	P											
9. Pan troglodytes X1	ES	DR	ED	IG	MP	PK	TG	SS	TV	DS	KD	ED	H	Y	SK	CD	C	I	H	R	L	E	Q	V	V	R	R	K	L	G	E	D	W	I	F	L	V	L	L	G	L	M	A	L	V	S	W	S	M	P											
10. Capra hircus X1	ES	DR	ED	IG	MP	PK	TG	SS	TV	DS	KD	ED	H	Y	SK	CD	C	I	H	R	L	E	Q	V	V	R	R	K	L	G	E	D	W	I	F	L	V	L	L	G	L	M	A	L	V	S	W	S	M	P											
11. Ovis aries X1	ES	DR	ED	IG	MP	PK	TG	SS	TV	DS	KD	ED	H	Y	SK	CD	C	I	H	R	L	E	Q	V	V	R	R	K	L	G	E	D	W	I	F	L	V	L	L	G	L	M	A	L	V	S	W	S	M	P											
12. Equus caballus	ES	DR	ED	IG	MP	PK	TG	SS	TV	DS	KD	ED	H	Y	SK	CD	C	I	H	R	L	E	Q	V	V	R	R	K	L	G	E	D	W	I	F	L	V	L	L	G	L	M	A	L	V	S	W	S	M	P											
13. Manis javanica	ES	DR	ED	IG	MP	PK	TG	SS	TV	DS	KD	ED	H	Y	SK	CD	C	I	H	R	L	E	Q	V	V	R	R	K	L	G	E	D	W	I	F	L	V	L	L	G	L	M	A	L	V	S	W	S	M	P											
14. Dipodomys ordii	YS	Y	A	Q	D	R	G	I	P	K	T	D	S	S	T	V	D	S	L	D	E	D	H	Y	SK	CD	C	V	H	R	L	E	Q	V	V	R	R	K	L	G	E	D	W	I	F	L	V	L	L	G	L	M	A	L	V	S	W	S	M	P	
15. Dasyus novemcinctus	ES	DR	ED	IG	MP	PK	TG	SS	TV	DS	KD	ED	H	Y	SK	CD	C	I	H	R	L	E	Q	V	V	R	R	K	L	G	E	D	W	I	F	L	V	L	L	G	L	M	A	L	V	S	W	S	M	P											

	140	150	160	170	180	190	200																																																								
1. Homo sapiens 1	Y	V	S	A	K	S	L	Q	A	Y	K	W	S	Y	Q	M	P	S	L	P	L	O	F	L	V	W	I	F	P	L	V	L	L	F	S	A	L	F	G	L	I	S	P	Q	A	V	G	S	G	I	P	E	M	K	T	I	L	R	G	V	I	L	K
2. Sus scrofa X1	Y	V	S	A	K	S	L	Q	A	Y	K	W	S	Y	Q	M	P	S	L	P	L	O	F	L	V	W	I	F	P	L	V	L	L	F	S	A	L	F	G	L	I	S	P	Q	A	V	G	S	G	I	P	E	M	K	T	I	L	R	G	V	I	L	K
3. Felis catus	Y	V	S	A	K	S	L	Q	A	Y	K	W	S	Y	Q	M	P	S	L	P	L	O	F	L	V	W	I	F	P	L	V	L	L	F	S	A	L	F	G	L	I	S	P	Q	A	V	G	S	G	I	P	E	M	K	T	I	L	R	G	V	I	L	K
4. Canis lupus familiaris	Y	V	S	A	K	S	L	Q	A	Y	K	W	S	Y	Q	M	P	S	L	P	L	O	F	L	V	W	I	F	P	L	V	L	L	F	S	A	L	F	G	L	I	S	P	Q	A	V	G	S	G	I	P	E	M	K	T	I	L	R	G	V	I	L	K
5. Bubalus bubalis	Y	V	S	A	K	S	L	Q	A	Y	K	W	S	Y	Q	M	P	S	L	P	L	O	F	L	V	W	I	F	P	L	V	L	L	F	S	A	L	F	G	L	I	S	P	Q	A	V	G	S	G	I	P	E	M	K	T	I	L	R	G	V	I	L	K
6. Mus musculus	Y	V	S	A	K	S	L	Q	A	Y	K	W	S	Y	Q	M	P	S	L	P	L	O	F	L	V	W	I	F	P	L	V	L	L	F	S	A	L	F	G	L	I	S	P	Q	A	V	G	S	G	I	P	E	M	K	T	I	L	R	G	V	I	L	K
7. Rattus norvegicus	Y	V	S	A	K	S	L	Q	A	Y	K	W	S	Y	Q	M	P	S	L	P	L	O	F	L	V	W	I	F	P	L	V	L	L	F	S	A	L	F	G	L	I	S	P	Q	A	V	G	S	G	I	P	E	M	K	T	I	L	R	G	V	I	L	K
8. Bos indicus X1	Y	V	S	A	K	S	L	Q	A	Y	K	W	S	Y	Q	M	P	S	L	P	L	O	F	L	V	W	I	F	P	L	V	L	L	F	S	A	L	F	G	L	I	S	P	Q	A	V	G	S	G	I	P	E	M	K	T	I	L	R	G	V	I	L	K
9. Pan troglodytes X1	Y	V	S	A	K	S	L	Q	A	Y	K	W	S	Y	Q	M	P	S	L	P	L	O	F	L	V	W	I	F	P	L	V	L	L	F	S	A	L	F	G	L	I	S	P	Q	A	V	G	S	G	I	P	E	M	K	T	I	L	R	G	V	I	L	K
10. Capra hircus X1	Y	V	S	A	K	S	L	Q	A	Y	K	W	S	Y	Q	M	P	S	L	P	L	O	F	L	V	W	I	F	P	L	V	L	L	F	S	A	L	F	G	L	I	S	P	Q	A	V	G	S	G	I	P	E	M	K	T	I	L	R	G	V	I	L	K
11. Ovis aries X1	Y	V	S	A	K	S	L	Q	A	Y	K	W	S	Y	Q	M	P	S	L	P	L	O	F	L	V	W	I	F	P	L	V	L	L	F	S	A	L	F	G	L	I	S	P	Q	A	V	G	S	G	I	P	E	M	K	T	I	L	R	G	V	I	L	K
12. Equus caballus	Y	V	S	A	K	S	L	Q	A	Y	K	W	S	Y	Q	M	P	S	L	P	L	O	F	L	V	W	I	F	P	L	V	L	L	F	S	A	L	F	G	L	I	S	P	Q	A	V	G	S	G	I	P	E	M	K	T	I	L	R	G	V	I	L	K
13. Manis javanica	Y	V	S	A	K	S	L	Q	A	Y	K	W	S	Y	Q	M	P	S	L	P	L	O	F	L	V	W	I	F	P	L	V	L	L	F	S	A	L	F	G	L	I	S	P	Q	A	V	G	S	G	I	P	E	M	K	T	I	L	R	G	V	I	L	K
14. Dipodomys ordii	Y	V	S	A	K	S	L	Q	A	Y	K	W	S	Y	Q	M	P	S	L	P	L	O	F	L	V	W	I	F	P	L	V	L	L	F	S	A	L	F	G	L	I	S	P	Q	A	V	G	S	G	I	P	E	M	K	T	I	L	R	G	V	I	L	K
15. Dasyus novemcinctus	Y	V	S	A	K	S	L	Q	A	Y	K	W	S	Y	Q	M	P	S	L	P	L	O	F	L	V	W	I	F	P	L	V	L	L	F	S	A	L	F	G	L	I																						





6- FIGURE 2: Alignment of the amino acid reference sequences of the *CLC1* protein from 15 different species of mammals. Sequences are identified according to table 22. Shown in white, gray and black are the different, similar and identical residues, respectively. Highlighted in red squares are the two residue changes found in myotonic animals, p.M76V and p.A920V respectively. Note that they are little conserved residues considering this alignment. Signed in blue bars are the amino acids that participate in the filter site selective to the chloride ion. Highlighted in green bars are the amino acids that form the two CBS domains. Highlighted in red bar region of deletion. The deletion encompasses a Y-selective filter site at position 578 and also, the initial 35 residues of the 60 residues forming the first CBS domain.

ANEXO 3 - Normas do periódico PLOS Genetics para elaboração de trabalho científico.

Disponível em <http://journals.plos.org/plosgenetics/s/submission-guidelines#loc-style-and-format>

Style and Format
 Manuscript Organization
 Parts of a Submission
 Additional Information Requested at Submission
 Other Article Types
 Give Feedback

Submission Guidelines

PLOS Genetics publishes original research that clearly demonstrates novelty, importance to a particular field, biological significance, and conclusions that are justified by the study.

Our aim is to make the editorial process rigorous and consistent, and to offer the best possible support to our authors throughout this process. Authors are encouraged to decide how best to present their ideas, results, and conclusions, but all research should be presented in a form that is readable to those in the field, easily understood by scientists outside of the immediate discipline, and comprehensible to readers whose first language is not English. The writing style should therefore be concise and accessible. Care should be taken to define abbreviations clearly and to use correct genetic and systematic nomenclature.

We strongly encourage authors to seek input from their co-authors and colleagues with different expertise when preparing their manuscript for submission to ensure that the style of writing, clarity of meaning, and spelling, punctuation, and grammar are at a very high level. A variety of style and writing guides are available, including *The Elements of Style* (New York: bartleby.com, 1999) and the Manuscript Preparation recommendations of the International Committee of Medical Journal Editors (ICMJE). Editors and/or reviewers may also make suggestions for how to achieve optimal quality and clarity of presentation, as well as potential cuts or additions that could strengthen the manuscript.

Related information for authors

- > Submission system
- > Journal scope and publication criteria
- > Getting started guide
- > Guidelines for other article types
- > Guidelines for revisions
- > Publication fees

Style and Format

File format	Manuscript files can be in the following formats: DOC, DOCX, RTF or PDF. Microsoft Word documents should not be locked or protected. LaTeX manuscripts must be submitted as PDFs. Read the LaTeX guidelines.
Length	Manuscripts can be any length. There are no restrictions on word count, number of figures, or amount of supporting information. We encourage you to present and discuss your findings concisely.
Font	Use a standard font size and any standard font, except for the font named "Symbol". To add symbols to the manuscript, use the Insert → Symbol function in your word processor or paste in the appropriate Unicode character.
Headings	Limit manuscript sections and sub-sections to 3 heading levels. Make sure heading levels are clearly indicated in the manuscript text.
Layout and spacing	Manuscript text should be double-spaced. Do not format text in multiple columns.
Page and line numbers	Include page numbers and line numbers in the manuscript file. Use continuous line numbers (do not restart the numbering on each page).
Footnotes	Footnotes are not permitted. If your manuscript contains footnotes, move the information into the main text or the reference list, depending on the content.
Language	Manuscripts must be submitted in English. You may submit translations of the manuscript or abstract as supporting information. Read the supporting information guidelines.

Abbreviations	Define abbreviations upon first appearance in the text.
	Do not use non-standard abbreviations unless they appear at least three times in the text.
	Keep abbreviations to a minimum.
Reference style	PLOS uses "Vancouver" style, as outlined in the ICMJE sample references.
	See reference formatting examples and additional instructions below.
Equations	We recommend using MathType for display and inline equations, as it will provide the most reliable outcome. If this is not possible, Equation Editor or Microsoft's Insert→Equation function is acceptable.
	Avoid using MathType, Equation Editor, or the Insert→Equation function to insert single variables (e.g., $a^2 + b^2 = c^2$), Greek or other symbols (e.g., β , Δ , or 'prime'), or mathematical operators (e.g., \times , \geq , or \pm) in running text. Wherever possible, insert single symbols as normal text with the correct Unicode (hex) values.
	Do not use MathType, Equation Editor, or the Insert→Equation function for only a portion of an equation. Rather, ensure that the entire equation is included. Equations should not contain a mix of different equation tools. Avoid "hybrid" inline or display equations, in which part is text and part is MathType, or part is MathType and part is Equation Editor.
Nomenclature	Use correct and established nomenclature wherever possible.
	<i>Units of measurement</i> Use SI units. If you do not use these exclusively, provide the SI value in parentheses after each value. Read more about SI units.
	<i>Drugs</i> Provide the Recommended International Non-Proprietary Name (rINN).
	<i>Species names</i> Write in italics (e.g., <i>Homo sapiens</i>). Write out in full the genus and species, both in the title of the manuscript and at the first mention of an organism in a paper. After first mention, the first letter of the genus name followed by the full species name may be used (e.g., <i>H. sapiens</i>).
	<i>Genes, mutations, genotypes, and alleles</i> Write in italics. Use the recommended name by consulting the appropriate genetic nomenclature database (e.g., HUGO for human genes). It is sometimes advisable to indicate the synonyms for the gene the first time it appears in the text. Gene prefixes such as those used for oncogenes or cellular localization should be shown in roman typeface (e.g., v-fes, c-MYC).
	<i>Allergens</i> The systematic allergen nomenclature of the World Health Organization/International Union of Immunological Societies (WHO/IUIS) Allergen Nomenclature Sub-committee should be used for manuscripts that include the description or use of allergenic proteins. For manuscripts describing new allergens, the systematic name of the allergen should be approved by the WHO/IUIS Allergen Nomenclature Sub-Committee prior to manuscript publication. Examples of the systematic allergen nomenclature can be found at the WHO/IUIS Allergen Nomenclature site.

Copyediting manuscripts

Prior to submission, authors who believe their manuscripts would benefit from in-depth professional copyediting are encouraged to use language-editing and copyediting services. Obtaining this service is the responsibility of the author and should be done before initial submission. These services can be found on the web using search terms like "scientific editing service" or "manuscript editing service".

Note that if your manuscript is accepted, PLOS will not perform a detailed copyediting step. Therefore, please carefully review your manuscript, paying special attention to spelling, punctuation, and grammar, as well as scientific content.

Manuscript Organization

Most manuscripts should be organized as follows. Instructions for each element appear below.

- › Title
- › Authors
- › Affiliations
- › Abstract
- › Author Summary
- › Introduction
- › Results
- › Discussion

On the title page, write author names in the following order:

- › First name (or initials, if used)
- › Middle name (or initials, if used)
- › Last name (surname, family name)

Each author on the list must have an affiliation. The affiliation includes department, university, or organizational affiliation and its location, including city, state/province (if applicable), and country. Authors have the option to include a current address in addition to the address of their affiliation at the time of the study. The current address should be listed in the byline and clearly labeled "current address." At a minimum, the address must include the author's current institution, city, and country.

If an author has multiple affiliations, enter all affiliations on the title page only. In the submission system, enter only the preferred or primary affiliation. Author affiliations will be listed in the typeset PDF article in the same order that authors are listed in the submission.

- ❗ Author names will be published exactly as they appear in the manuscript file. Please double-check the information carefully to make sure it is correct.

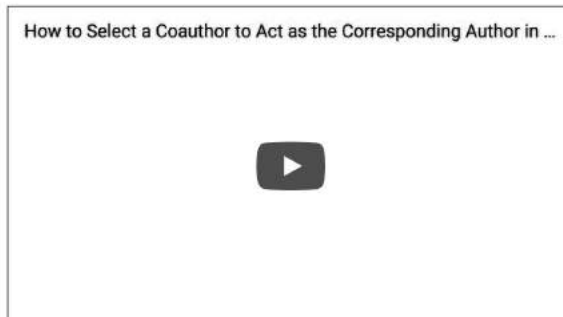
Corresponding author

The submitting author is automatically designated as the corresponding author in the submission system. The corresponding author is the primary contact for the journal office and the only author able to view or change the manuscript while it is under editorial consideration.

The corresponding author role may be transferred to another coauthor. However, note that transferring the corresponding author role also transfers access to the manuscript. (To designate a new corresponding author while the manuscript is still under consideration, watch the video tutorial below.)

Only one corresponding author can be designated in the submission system, but this does not restrict the number of corresponding authors that may be listed on the article in the event of publication. Whoever is designated as a corresponding author on the title page of the manuscript file will be listed as such upon publication. Include an email address for each corresponding author listed on the title page of the manuscript.

▶ How to select a new corresponding author in Editorial Manager



Consortia and group authorship

If a manuscript is submitted on behalf of a consortium or group, include the consortium or group name in the author list. The consortium or group name should be listed in the manuscript file only, and not included in the online submission form. You may include the full list of members in the Acknowledgments or in a supporting information file. Please be aware that as of October 2016, the National Library of Medicine's (NLM) policy has changed and PubMed will only index individuals and the names of consortia or group authors listed in the author byline itself. Individual consortium or group author members need to be listed in the author byline in order to be indexed, and if included in the byline, must qualify for authorship according to our criteria.

- ❗ Read the group authorship policy.

Author contributions

Provide at minimum one contribution for each author in the submission system. Use the CRediT taxonomy to describe each contribution. Read the policy and the full list of roles.

Contributions will be published with the final article, and they should accurately reflect contributions to the work. The submitting author is responsible for completing this information at submission, and we expect that all authors will have reviewed, discussed, and agreed to their individual contributions ahead of this time.

Cover letter

Upload a cover letter as a separate file in the online system.

The cover letter should address the following questions:

- › Why is this manuscript suitable for publication in *PLOS Genetics*?
- › Why will your study inspire the other members of your field, and how will it drive research forward?

You may recommend a suitable Associate Editor to handle your submission; however, the editors reserve the right to contact an alternative—either from the board or a guest editor.

The cover letter will be available to the editors and to any external peer reviewers, so please send anything confidential directly to the journal office.

Title page

The title, authors, and affiliations should all be included on a title page as the first page of the manuscript file.



Download our sample title, author list, and affiliations page (PDF)

Abstract

The Abstract comes after the title page in the manuscript file. The abstract text is also entered in a separate field in the submission system.

The Abstract of the paper should be succinct; it must not exceed 300 words. Authors should mention the techniques used without going into methodological detail and should summarize the most important results

While the Abstract is conceptually divided into three sections (Background, Methodology/Principal Findings and Conclusions/Significance), do not apply these distinct headings to the Abstract within the article file.

Do not include any citations. Avoid specialist abbreviations.

Author Summary

We ask that all authors of research articles include a 150–200 word non-technical summary of the work as part of the manuscript to immediately follow the abstract. This text is subject to editorial change, should be written in the first-person voice, and should be distinct from the scientific abstract.

Aim to highlight where your work fits within a broader context; present the significance or possible implications of your work simply and objectively; and avoid the use of acronyms and complex terminology wherever possible. The goal is to make your findings accessible to a wide audience that includes both scientists and non-scientists.

Authors may benefit from consulting with a science writer or press officer to ensure they effectively communicate their findings to a general audience.

Example Author Summaries

Complex Seizure Disorder Caused by *Bruno14* Deficiency in Mice

Genome-Wide Association Scan Shows Genetic Variants in the *FTO* Gene Are Associated with Obesity-Related Traits

A Mutation in the Myostatin Gene Increases Muscle Mass and Enhances Racing Performance in Heterozygote Dogs

Introduction

The Introduction should put the focus of the manuscript into a broader context. As you compose the Introduction, think of readers who are not experts in this field. Include a brief review of the key literature. If there are relevant controversies or disagreements in the field, they should be mentioned so that a non-expert reader can delve into these issues further. The Introduction should conclude with a brief statement of the overall aim of the experiments and a comment about whether that aim was achieved.

Results

The Results section should provide details of all of the experiments that are required to support the conclusions of the paper. There is no specific word limit for this section, but details of experiments that are peripheral to the main thrust of the article and that detract from the focus of the article should not be included. The section may be divided into subsections, each with a concise subheading. The section should be written in the past tense.

PLOS journals require authors to make all data underlying the findings described in their manuscript fully available without restriction, with rare exception. When submitting a manuscript online, authors must provide a *Data Availability Statement* describing compliance with PLOS's policy.

Large data sets, including raw data, may be deposited in an appropriate public repository. See our list of recommended repositories.

For smaller data sets and certain data types, authors may provide their data within supporting information files accompanying the manuscript. Authors should take care to maximize the accessibility and reusability of the data by selecting a file format from which data can be efficiently extracted (for example, spreadsheets or flat files should be provided rather than PDFs when providing tabulated data).

For more information on how best to provide data, read our policy on data availability. PLOS does not accept references to "data not shown."

Discussion

The Discussion should spell out the major conclusions of the work along with some explanation or speculation on the significance of these conclusions. How do the conclusions affect the existing assumptions and models in the field? How can future research build on these observations? What are the key experiments that must be done?

The Discussion should be concise and tightly argued.

The Results and Discussion may be combined into one section, if desired.

Materials and Methods

The Materials and Methods should provide enough detail for reproduction of the findings. Submit detailed protocols for newer or less established methods. Well-established protocols may simply be referenced.

Details of algorithms and protocol documents for clinical trials, observational studies, and other **non-laboratory** investigations may be uploaded as supporting information. These are not included in the typeset manuscript, but are downloadable and fully searchable from the HTML version of the article. Read the supporting information guidelines for formatting instructions.

We recommend and encourage you to deposit **laboratory protocols** in protocols.io, where protocols can be assigned their own persistent digital object identifiers (DOIs).

To include a link to a protocol in your article:

1. Describe your step-by-step protocol on protocols.io
2. Select **Get DOI** to issue your protocol a persistent digital object identifier (DOI)
3. Include the DOI link in the Methods section of your manuscript using the following format provided by protocols.io:
<http://dx.doi.org/10.17504/protocols.io> [PROTOCOL DOI]

At this stage, your protocol is only visible to those with the link. This allows editors and reviewers to consult your protocol when evaluating the manuscript. You can make your protocols public at any time by selecting **Publish** on the protocols.io site. Any referenced protocol(s) will automatically be made public when your article is published.

Consult our reporting guidelines, and include an ethics statement in the Materials and Methods section when reporting results from human subjects research and animal research.

Acknowledgments

Those who contributed to the work but do not meet our authorship criteria should be listed in the Acknowledgments with a description of the contribution.

Authors are responsible for ensuring that anyone named in the Acknowledgments agrees to be named.

- i** Do not include funding sources in the Acknowledgments or anywhere else in the manuscript file. Funding information should only be entered in the financial disclosure section of the submission system.

References

Any and all available works can be cited in the reference list. Acceptable sources include:

- › Published or accepted manuscripts
- › Manuscripts on preprint servers, providing the manuscript has a citable DOI or arXiv URL.

Do not cite the following sources in the reference list:

- › Unavailable and unpublished work, including manuscripts that have been submitted but not yet accepted (e.g., "unpublished work," "data not shown"). Instead, include those data as supplementary material or deposit the data in a publicly available database.
- › Personal communications (these should be supported by a letter from the relevant authors but not included in the reference list)

References are listed at the end of the manuscript and numbered in the order that they appear in the text. In the text, cite the reference number in square brackets (e.g., "We used the techniques developed by our colleagues [19] to analyze the data"). PLOS uses the numbered citation (citation-sequence) method and first six authors, et al.

Do not include citations in abstracts or author summaries.

Make sure the parts of the manuscript are in the correct order *before* ordering the citations.

Formatting references

i Because all references will be linked electronically as much as possible to the papers they cite, proper formatting of the references is crucial.

PLOS uses the reference style outlined by the International Committee of Medical Journal Editors (ICMJE), also referred to as the "Vancouver" style. Example formats are listed below. Additional examples are in the ICMJE sample references.

A reference management tool, EndNote, offers a current style file that can assist you with the formatting of your references. If you have problems with any reference management program, please contact the source company's technical support.

Journal name abbreviations should be those found in the National Center for Biotechnology Information (NCBI) databases.

Source	Format
Published articles	<p>Hou WR, Hou YL, Wu GF, Song Y, Su XL, Sun B, et al. cDNA, genomic sequence cloning and overexpression of ribosomal protein gene L9 (rpL9) of the giant panda (<i>Ailuropoda melanoleuca</i>). <i>Genet Mol Res.</i> 2011;10: 1576-1588.</p> <p>Devaraju P, Gulati R, Antony PT, Mithun CB, Negi VS. Susceptibility to SLE in South Indian Tamils may be influenced by genetic selection pressure on TLR2 and TLR9 genes. <i>Mol Immunol.</i> 2014 Nov 22. pii: S0161-5890(14)00313-7. doi: 10.1016/j.molimm.2014.11.005.</p> <p><i>Note: A DOI number for the full-text article is acceptable as an alternative to or in addition to traditional volume and page numbers. When providing a DOI, adhere to the format in the example above with both the label and full DOI included at the end of the reference (doi: 10.1016/j.molimm.2014.11.005). Do not provide a shortened DOI or the URL.</i></p>
Accepted, unpublished articles	Same as published articles, but substitute "Forthcoming" for page numbers or DOI.
Online articles	Huynen MMTE, Martens P, Hilderink HBM. The health impacts of globalisation: a conceptual framework. <i>Global Health.</i> 2005;1: 14. Available from: http://www.globalizationandhealth.com/content/1/1/14
Books	Bates B. Bargaining for life: A social history of tuberculosis. 1st ed. Philadelphia: University of Pennsylvania Press; 1992.
Book chapters	Hansen B. New York City epidemics and history for the public. In: Harden VA, Risse GB, editors. <i>AIDS and the historian.</i> Bethesda: National Institutes of Health; 1991. pp. 21-28.
Deposited articles (preprints, e-prints, or arXiv)	Krick T, Shub DA, Verstraete N, Ferreiro DU, Alonso LG, Shub M, et al. Amino acid metabolism conflicts with protein diversity; 1991. Preprint. Available from: arXiv:1403.3301v1 . Cited 17 March 2014.
Published media (print or online newspapers and magazine articles)	Fountain H. For Already Vulnerable Penguins, Study Finds Climate Change Is Another Danger. <i>The New York Times.</i> 29 Jan 2014. Available from: http://www.nytimes.com/2014/01/30/science/earth/climate-change-taking-toll-on-penguins-study-finds.html Cited 17 March 2014.
New media (blogs, web sites, or other written works)	Allen L. Announcing PLOS Blogs. 2010 Sep 1 [cited 17 March 2014]. In: PLOS Blogs [Internet]. San Francisco: PLOS 2006 - . [about 2 screens]. Available from: http://blogs.plos.org/plos/2010/09/announcing-plos-blogs/ .
Masters' theses or doctoral dissertations	Wells A. Exploring the development of the independent, electronic, scholarly journal. M.Sc. Thesis, The University of Sheffield. 1999. Available from: http://cumincad.scix.net/cgi-bin/works/Show72e09
Databases and repositories (Figshare, arXiv)	Roberts SB. QPX Genome Browser Feature Tracks; 2013 [cited 2013 Oct 5]. Database: figshare [Internet]. Available from: http://figshare.com/articles/QPX_Genome_Browser_Feature_Tracks/701214
Multimedia (videos, movies, or TV shows)	Hitchcock A, producer and director. <i>Rear Window</i> [Film]; 1954. Los Angeles: MGM.

Supporting Information

Authors can submit essential supporting files and multimedia files along with their manuscripts. All supporting information will be subject to peer review. All file types can be submitted, but files must be smaller than 10 MB in size.

Authors may use almost any description as the item name for a supporting information file as long as it contains an "S" and number. For example, "S1 Appendix" and "S2 Appendix," "S1 Table" and "S2 Table," and so forth.

Supporting information files are published exactly as provided, and are not copyedited.

Supporting information captions

List supporting information captions at the end of the manuscript file. Do not submit captions in a separate file.

The file number and name are required in a caption, and we highly recommend including a one-line title as well. You may also include a legend in your caption, but it is not required.

Example caption

S1 Text. Title is strongly recommended. Legend is optional.

In-text citations

We recommend that you cite supporting information in the manuscript text, but this is not a requirement. If you cite supporting information in the text, citations do not need to be in numerical order.

- i** Read the supporting information guidelines for more details about submitting supporting information and multimedia files.

Figures and Tables

Figure files

Each figure must be prepared and submitted as an individual file.

Cite figures in ascending numeric order upon first appearance in the manuscript file.

- i** For detailed instructions, read the guidelines for figures.

Figure Captions

If you are submitting a **new or revised manuscript**, place captions in a group at the end of the manuscript file.

After editorial acceptance, captions must be inserted in read order in the manuscript text, immediately following the paragraph in which the figure is first cited. Do not include captions as part of the figure files themselves or submit them in a separate document.

At a minimum, include the following in your figure captions:

- A figure label with Arabic numerals, and "Figure" abbreviated to "Fig" (e.g. Fig 1, Fig 2, Fig 3, etc). Match the label of your figure with the name of the file uploaded at submission (e.g. a figure citation of "Fig 1" must refer to a figure file named "Fig1.tif").
- A concise, descriptive title

The caption may also include a legend as needed.

- i** For detailed instructions, read the guidelines for figures.

Data presentation in graphs

To better illustrate your results and to improve the reader's understanding and interpretation of your data, we discourage the use of bar graphs and line plots for continuous data, particularly for studies with small sample sizes ($n \leq 9$ independent observations per group).

- i** See this Perspective for more information about our position on data presentation in graphs: Weissgerber TL, Milic NM, Winham SJ, Garovic VD (2015) Beyond Bar and Line Graphs: Time for a New Data Presentation Paradigm. *PLoS Biol* 13(4): e1002128. doi:10.1371/journal.pbio.1002128
- We recommend that continuous data is presented in such a way that the reader can evaluate the distribution of the individual data points. Scatterplots, boxplots, and histograms are more informative than bar or line charts.
- If there is a particular reason that bar or line graphs are preferred, these must include inferential error bars: SD - standard deviation of the population, or CI - confidence intervals.
- Paired or non-independent data should be presented to include information about whether changes are consistent across individuals.

- Figures presenting small sample size data (n≤9 independent observations per group) should show the full distribution of the data, as opposed to summary statistics.
- All numerical values used to generate graphs must be provided as per the PLOS Data Availability policy.

i For more information about our Data Availability policy, see this Editorial:
Bloom T, Ganley E, Winker M (2014) Data Access for the Open Access Literature: PLOS's Data Policy. *PLoS Biol* 12(2): e1001797. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1001797>

For *PLOS Genetics*-specific guidance, read:
Barsh GS, Cooper GM, Copenhaver GP, Gibson G, McCarthy MI, Tang H, et al. (2015) PLOS Genetics Data Sharing Policy: In Pursuit of Functional Utility. *PLoS Genet* 11(12): e1005716. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1005716>

Tables

Cite tables in ascending numeric order upon first appearance in the manuscript file.

Place each table in your manuscript file directly after the paragraph in which it is first cited (read order). Do not submit your tables in separate files.

Tables require a label (e.g., "Table 1") and brief descriptive title to be placed above the table. Place legends, footnotes, and other text below the table.

i Read the guidelines for tables.

Data reporting

All data and related metadata underlying the findings reported in a submitted manuscript should be deposited in an appropriate public repository, unless already provided as part of the submitted article.

i Read our policy on data availability.

Repositories may be either subject-specific (where these exist) and accept specific types of structured data, or generalist repositories that accept multiple data types. We recommend that authors select repositories appropriate to their field. Repositories may be subject-specific (e.g., GenBank for sequences and PDB for structures), general, or institutional, as long as DOIs or accession numbers are provided and the data are at least as open as CC BY. Authors are encouraged to select repositories that meet accepted criteria as trustworthy digital repositories, such as criteria of the Centre for Research Libraries or Data Seal of Approval. Large, international databases are more likely to persist than small, local ones.

i See our list of recommended repositories.

To support data sharing and author compliance of the PLOS data policy, we have integrated our submission process with a select set of data repositories. The list is neither representative nor exhaustive of the suitable repositories available to authors. Current repository integration partners include Dryad and FlowRepository. Please contact data@plos.org to make recommendations for further partnerships.

Instructions for PLOS submissions with data deposited in an integration partner repository:

- Deposit data in the integrated repository of choice.
- Once deposition is final and complete, the repository will provide you with a dataset DOI (provisional) and private URL for reviewers to gain access to the data.
- Enter the given data DOI into the full Data Availability Statement, which is requested in the Additional Information section of the PLOS submission form. Then provide the URL passcode in the Attach Files section.

If you have any questions, please email us.

Accession numbers

All appropriate data sets, images, and information should be deposited in an appropriate public repository. See our list of recommended repositories.

Accession numbers (and version numbers, if appropriate) should be provided in the Data Availability Statement. Accession numbers or a citation to the DOI should also be provided when the data set is mentioned within the manuscript.

In some cases authors may not be able to obtain accession numbers or DOIs until the manuscript is accepted; in these cases, the authors must provide these numbers at acceptance. In all other cases, these numbers must be provided at submission.

Identifiers

As much as possible, please provide accession numbers or identifiers for all entities such as genes, proteins, mutants, diseases, etc., for which there is an entry in a public database, for example:

- › Ensembl
- › Entrez Gene
- › FlyBase
- › InterPro
- › Mouse Genome Database (MGD)
- › Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM)
- › PubChem

Identifiers should be provided in parentheses after the entity on first use.

Research Resource Identifiers

Research Resource Identifiers are unique Resource Identifiers (RRIDs) for citing resources used in the research. We encourage authors to use RRIDs within the text of their papers to identify their model organisms, antibodies, or tools.

PLOS is a part of the Research Resource Identification Initiative (#RII), a cross-publisher effort to enable effective tracking of the utilization of particular research resources across all biomedical literature and promote reproducibility in science. RRIDs are found via the RRID portal.

If an RRID does not exist, you may create a new one as needed through the RRID Portal. The Research Resource Citation guidelines provide instructions on how to cite the resource in the manuscript.

Small and macromolecule crystal data

Manuscripts reporting new and unpublished three-dimensional structures must include sufficient supporting data and detailed descriptions of the methodologies used to allow the reproduction and validation of the structures. All novel structures must have been deposited in a community endorsed database prior to submission (please see our list of recommended repositories).

Small molecule single crystal data

Authors reporting X-Ray crystallographic structures of small organic, metal-organic, and inorganic molecules must deposit their data with the Cambridge Crystallographic Data Centre (CCDC), the Inorganic Crystal Structure Database (ICSD), or similar community databases providing a recognized validation functionality. Authors are also required to include the relevant structure reference numbers within the main text (e.g. the CCDC ID number), as well as the crystallographic information files (.cif format) as Supplementary Information, along with the checkCIF validation reports that can be obtained via the International Union of Crystallography (IUCr).

Macromolecular structures

Authors reporting novel macromolecular structures must have deposited their data prior to submission with the Worldwide Protein Data Bank (wwPDB), the Biological Magnetic Resonance Data Bank (BMRB), the Electron Microscopy Data Bank (EMDB), or other community databases providing a recognized validation functionality. Authors must include the structure reference numbers within the main text and submit as Supplementary Information the official validation reports from these databases.

Striking image

You can choose to upload a "Striking Image" that we may use to represent your article online in places like the journal homepage. All striking image files that are submitted are also eligible to be chosen as the monthly Issue Image.

Submission Criteria

- › The image must visually represent the article in a striking and eye-catching way.
- › It can be derived from a figure or supporting information file from the paper, and it may be a cropped portion of an image or the entire image.
- › Alternatively, you may create or source an image which represents the article, as long as it adheres to our CC BY license.
- › High resolution: between 300-600 dpi
- › Single panel
- › Ideally avoid added details like text, scale bars, and arrows.

How to Submit

1. Submit your striking image to the submission system using the file type "Striking Image".
2. Upload a separate file containing the corresponding caption.

If no striking image is uploaded, a member of the journal team will choose an appropriate image, which may be a figure from the submission or a separately sourced CC BY image.

i Striking images should not contain potentially identifying images of people. Read our policy on identifying information.

The PLOS licenses and copyright policy also applies to striking images.

Additional Information Requested at Submission

Funding Statement


This section should describe sources of funding that have supported the work. Please include relevant grant numbers and the URL of any funder's web site. Please also include this sentence: "The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript." If this statement is not correct, you must describe the role of any sponsors or funders, and amend the aforementioned sentence as needed.

 [Read our policy on disclosure of funding sources.](#)

Competing Interests


The corresponding author is asked at submission to declare, on behalf of all authors, whether there are any financial, personal, or professional interests that could be construed to have influenced the work.

Any relevant competing interests of authors must be available to editors and reviewers during the review process and will be stated in published articles.

 [Read our policy on competing interests.](#)

Related manuscripts

When submitting a manuscript, all authors are asked to indicate that they do not have a related or duplicate manuscript under consideration (or accepted) for publication elsewhere. If related work has been or will be submitted elsewhere or is in press elsewhere, then a copy must be uploaded with the article submitted to PLOS. Reviewers will be asked to comment on the overlap between related submissions.

 [Read our policies on related manuscripts.](#)

Preprints

PLOS encourages authors to post preprints as a way to accelerate the dissemination of research and supports authors who wish to share their work early and receive feedback before formal peer review. Deposition of manuscripts with preprint servers does not impact consideration of the manuscript at any PLOS journal.

Authors posting on bioRxiv may concurrently submit directly to select PLOS journals through bioRxiv's direct transfer to journal service.

Authors submitting manuscripts in the life sciences to *PLOS Genetics* may opt-in to post their work on bioRxiv during the *PLOS Genetics* initial submission process.

 [Read more about preprints.](#)

[Learn how to post a preprint to bioRxiv during *PLOS Genetics* initial submission.](#)

Reviewer and editor suggestions

We ask authors to suggest suitable editors and at least four potential reviewers when submitting their manuscript. Bear in mind any potential competing interests when making these suggestions. It is not appropriate to suggest recent collaborators or other researchers at your institution. See our policy on competing interests for more information.

Opposed reviewers

Authors may choose to request that an individual is excluded from the review process and not involved in their manuscript. When making these suggestions, please provide specific reasons why each person should not review your submission in each "Reason" box. The editorial team will respect these requests so long as this does not interfere with the objective and thorough assessment of the submission.

Other Article Types

If you are submitting content other than a research article, read the guidelines for other article types.

Give Feedback