

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

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

DAIANE DE JESUS RODRIGUES

BOTUCATU - SP

2019

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

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

DAIANE DE JESUS RODRIGUES

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

Orientador: Prof. Dr. Alexandre Secorun Borges

Coorientador: Prof. Dr. José Paes de Oliveira Filho

BOTUCATU - SP

2019

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP

BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSANGELA APARECIDA LOBO-CRB 8/7500

Rodrigues, Daiane de Jesus.

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

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

Orientador: Alexandre Secorun Borges

Coorientador: José Paes de Oliveira Filho

Capes: 50501062

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

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

Nome do Autor: Daiane de Jesus Rodrigues

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

COMISSÃO EXAMINADORA

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

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

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

Data da defesa: 24 de setembro de 2019.

Agradecimentos

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

LISTA DE FIGURAS

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

LISTA DE TABELAS

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

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

LISTA DE ANEXOS

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

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

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

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

SUMÁRIO

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

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

RESUMO

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

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

ABSTRACT

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

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

CAPÍTULO I

1. INTRODUÇÃO

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

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

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

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

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

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

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

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

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

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Aspectos Gerais da Miotonia

Adolf Strümpell propôs o termo miotonia alguns anos após a primeira descrição da miotonia hereditária, feita por Thomsen (1925 apud RÜDEL; LEHMANN-HORN, 1985). Nessa descrição a miotonia caracterizava-se pela incontável tensão muscular após a contração voluntária e era descrita como uma incapacidade de relaxamento, contração prolongada ou relaxamento retardado (RÜDEL; LEHMANN-HORN, 1985).

A miotonia é definida, atualmente, como o distúrbio de atraso no relaxamento do músculo, que resulta em contração sustentada após despolarização inicial (DEWEY; TALARICO, 2017).

As síndromes miotônicas compõem um grupo de enfermidades caracterizadas por miotonia associada a demais disfunções musculares. A classificação das miotonias é geralmente baseada na hereditariedade e na apresentação clínica e no defeito molecular (LIPICKY, 1979).

As miotonias podem ou não estar associadas a distrofia muscular (ZHANG *et al.*, 1996) e caracterizar-se como hereditárias (ALEJO-GONZÁLEZ *et al.*, 2016) ou adquiridas (CHEN *et al.*, 2010).

A miotonia distrófica é uma enfermidade neuromuscular degenerativa que apresenta miotonia associada à distrofia e fraqueza muscular progressiva, descrita pela primeira vez em 1909, pelo neurologista Hans Gustav Wilhelm Steinert (apud MISHRA *et al.*, 2018).

Em humanos, dois tipos de distrofias miotônicas são conhecidas: DM1 e DM2. Embora ambas manifestem alterações multissistêmicas, a DM1 representa maior gravidade clínica pela possibilidade de expressar-se como congênita (YETKIN *et al.*, 2018) e por acometer severamente o sistema nervoso central (ANDRÉ *et al.*, 2018). A DM2 geralmente apresenta um espectro de sintomas leves, embora heterogêneo (BOZOVIC *et al.*, 2018).

Quanto às miotonias não distróficas, são divididas em dois grandes grupos: as que implicam em disfunção dos canais de cloreto e as com disfunção dos canais

de sódio (MONTAGNESE; SCHOSER, 2018). A miotonia hereditária resulta da disfunção do canal de cloreto CLC1 (COLDING-JORGENSEN, 2005). A paralisia periódica hipercalêmica com miotonia, a paramiotonia congênita e a miotonia agravada pelo potássio são as canalopatias relacionadas aos distúrbios do canal de sódio (SCHNEIDER-GOLD *et al.*, 2018).

2.2. Miotonia Não Distrófica

As miotonias não distróficas caracterizam-se por miotonia não associada a distrofia, causada pela disfunção dos principais canais de íons do músculo esquelético. Incluem as miotonias decorrentes de defeitos no canal de sódio muscular (paramiotonia congênita, paralisia periódica hipercalêmica e miotonia agravada por potássio) e a miotonia decorrente de defeito no canal de cloro muscular (miotonia hereditária) (VICART *et al.*, 2005; MATTHEWS *et al.*, 2010).

Quando se trata de mutações no gene *SCN4A*, os sintomas podem variar de miotonia leve à rigidez muscular grave ou episódios de paralisia (TRIP *et al.*, 2009). As miotonias não distróficas causadas por mutações no gene *CLCN1* são caracterizadas por hipertrofia muscular, relaxamento tardio após contração que melhora conforme é mantida a atividade muscular (fenômeno “*warm up*”) (GUTMANN; PHILLIPS, 1991; COLDING-JORGENSEN, 2005; AMRITA LAKRAJ *et al.*, 2013).

Na paramiotonia congênita (PC) os sintomas são fraqueza episódica, sensibilidade ao frio e miotonia agravada pelo exercício, manifestando-se de maneira paradoxal ao fenômeno *warm-up* (RICKER *et al.*, 1986; STREIB, 1991). A miotonia pode estar presente na paralisia periódica hipercalêmica (HYPP); no entanto, a fraqueza episódica é o sintoma mais comum em humanos (PTEČEK *et al.*, 1994; HUDSON *et al.*, 1995; LEHMANN-HORN; RÜDEL, 1995).

A miotonia agravada por potássio caracteriza-se pela sensibilidade ao frio e miotonia exacerbada pela ingestão de potássio (KUBOTA, 2009). Apresenta três conhecidas variações fenotípicas, são conhecidas como miotonia congênita responsiva à acetazolamida (PTACEK *et al.*, 1991), miotonia flutuante (LENNOX *et al.*, 1992) e miotonia persistente (MCCLATCHEY *et al.*, 1992).

Os defeitos genéticos envolvidos na miotonia não distrófica não eram conhecidos até 1990. Posterior a esse período, a maioria dos distúrbios foram relacionados com mutações em genes que codificam canais iônicos dependentes de voltagem. As denominadas canalopatias musculares passaram a ser classificadas em distúrbios do canal de sódio e distúrbios do canal de cloro (BERCHTOLD *et al.*, 2000).

As miotonias do canal de sódio (paramiotonia congênita, paralisia periódica hipercalêmica e miotonia agravada por potássio) são distúrbios musculares hereditários resultantes de mutações pontuais no gene *SCN4A*, codificador do canal de sódio do músculo esquelético humano (RUDEL; LEHMANN-HORN, 1997).

Em animais, a paralisia periódica hipercalêmica já foi descrita em cavalos, causando episódios intermitentes de tremor muscular, crises de paralisia do músculo esquelético e fraqueza, induzidas por potássio. Uma mutação pontual que substitui fenilalanina por leucina foi identificada no gene *SCN4A* do músculo esquelético equino (RUDOLPH *et al.*, 1992; NAYLOR, 1994; SLOET, 1999).

Camundongos manifestaram fraqueza, miotonia e paralisia causada por sensibilidade ao potássio quando uma mutação descrita em humanos, de substituição de metionina por uma valina, foi induzida no canal de sódio do músculo esquelético do animal, sendo a espécie um modelo experimental para a enfermidade em humanos (HAYWARD *et al.*, 2008).

Quanto aos canais de cloro voltagem dependente do músculo esquelético, a miotonia não distrófica envolvida é a miotonia hereditária, resultante de mutações no gene *CLCN1* que determinam alterações na condutibilidade ao íon cloreto pelo sarcolema (JING *et al.*, 2018). Compreender a importância do gene *CLCN1* e a função do canal de cloreto CLC-1 é requisito fundamental para o estudo do impacto das diferentes mutações na fisiopatogenia da miotonia hereditária (TSUJINO, 2011).

Dentre as miotonias não distróficas, a miotonia hereditária, considerada a mais comum na espécie humana, é também a que possui mais descrições em animais (MATTHEWS *et al.*, 2010). Hipertrofia muscular, atraso no relaxamento muscular após contração e o fenômeno “*warm up*”, bem como algumas mutações no gene *CLCN1* foram descritas em búfalos (BORGES *et al.*, 2013), cabras (BECK *et al.*, 1996), cães (RHODES *et al.*, 1999), camundongos (STEINMEYER *et al.*, 1991;

PAPIZAN *et al.*, 2017), cavalos (WIJNBERG *et al.*, 2012), gatos (GANDOLFI *et al.*, 2014), ovelhas (MONTEAGUDO *et al.*, 2015) e suínos (ARAÚJO *et al.*, 2017).

2.2.1. Canais de Cloro

Thomas Jentsch foi o primeiro a clonar e descrever a estrutura do canal de cloro (CLC-0) dependente de voltagem (JENTSCH *et al.*, 1990). Posteriormente, descrições de canais semelhantes ao CLC-0 foram publicadas consistindo em uma família composta por nove membros: CLC-1, CLC-2, CLC-Ka, CLC-Kb, CLC-3, CLC-4, CLC-5, CLC-6 e CLC-7 (CURI *et al.*, 2009).

O poro do canal de cloro assemelha-se a forma de uma ampulheta, com uma constrição no centro da membrana, denominada filtro de seletividade. O íon cloro influencia a abertura do canal, conferindo ao canal a dependência de voltagem (DUTZLER, 2002).

Os canais de cloro são distribuídos em diferentes tecidos, em membranas plasmáticas e organelas intracelulares (STEINMEYER *et al.*, 1991). Os CLC contribuem em processos que regulam funções fisiológicas como, por exemplo, controle da liberação de neurotransmissores, manutenção da normalidade da excitação celular e transporte de íons (GANDOLFI *et al.*, 2014). Esses canais regulam a excitabilidade elétrica e estabilizam o potencial de repouso da membrana (STEINMEYER *et al.*, 1994).

Defeitos moleculares no canal CLC-1 estão relacionados à formas autossômica dominante e autossômica recessiva da miotonia hereditária (DUTZLER, 2002). O CLC-2 tem importante participação na regulação do volume celular e da excitabilidade neuronal. O CLC-5 é altamente expresso no rim e em menor grau no pulmão e cérebro. As características dos demais canais ainda não são totalmente conhecidas (BRANDT; JENTSCH, 1995).

2.2.1.1. Canais de cloro CLC-1

O gene *CLCN1* é o codificante para o canal de cloro CLC-1 do músculo esquelético (JENTSCH, 2015; PENG *et al.*, 2016). Em cães, espécie abordada neste estudo, o gene está localizado no cromossomo 16 (NC_006598.3). O RNAm é constituído por 4.715 pb e 23 éxons (TABELA 1), que codificam 976 aminoácidos.

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

ÉXON	TAMANHO (Pares de Bases)	ÍNTRON	TAMANHO (Pares de Bases)
1	271	1	2.858
2	121	2	391
3	132	3	559
4	129	4	252
5	134	5	1.242
6	78	6	1.002
7	79	7	5.322
8	126	8	281
9	85	9	188
10	102	10	303
11	85	11	255
12	150	12	4.975
13	70	13	175
14	111	14	1.968
15	214	15	236
16	134	16	1.647
17	227	17	302
18	112	18	330
19	80	19	250
20	39	20	2.973
21	105	21	89
22	87	22	496
23	2.044	-	-

Os canais seletivos para o íon cloreto constituem-se de duas subunidades proteicas idênticas (TANG; CHEN, 2011). Cada subunidade forma um poro condutor e, portanto, cada canal exibe dois poros, os CLC constituem dímeros transmembranares com condutância independente de íons em cada monômero (SAVIANE *et al.*, 1999; POROCA *et al.*, 2017).

Os CLC-1 são responsáveis pelo transporte dependente de voltagem dos íons Cl^- através das membranas celulares, atuando na regulação do potencial de repouso das membranas musculo esqueléticas e, conseqüentemente, mantendo constante o equilíbrio no processo de excitabilidade das fibras musculares (IMBRICI *et al.*, 2015).

Em repouso, as fibras musculares de mamíferos apresentam elevada permeabilidade de membrana para íons Cl^- , aproximadamente 70-85% da condutância de membrana é realizada pelos canais iônicos CLC-1 (STEINMEYER *et al.*, 1991).

A distribuição passiva e a elevada condutância de cloreto permitem ao CLC-1 conduzir corrente de membrana para repolarização da membrana muscular. Como resultado da membrana em estado de repouso (polarizada), é cessada a contração muscular e verificado o relaxamento muscular após contração. No entanto, quando a condutância de cloreto é reduzida a 20% (BARCHI, 1975) ocorre o retardo da repolarização sarcolemal após despolarização. Além disso, essa situação favorece a ocorrência de potenciais de ação repetitivos não evocados decorrentes ao estado de hiperexcitabilidade do músculo esquelético (CANNON, 2006; PEDERSEN *et al.*, 2016).

2.2.2. Miotonia hereditária

A miotonia hereditária é uma canalopatia que resulta de mutação no gene *CLCN1*, que codifica o principal canal seletivo para o íon cloreto da musculatura esquelética (CLC-1) (STEINMEYER *et al.*, 1994). Esse distúrbio caracteriza-se pelo comprometimento funcional do canal de cloro e implica no atraso da repolarização do sarcolema. Secundário a esse evento ocorre o acúmulo de íons potássio no sistema T-tubular e esse acúmulo favorece a ocorrência do estado de hiperexcitabilidade do sarcolema, promovendo contração muscular contínua após a despolarização inicial (DEWEY, 2005).

Dessa forma, indivíduos acometidos pela MH apresentam um relaxamento tardio da musculatura esquelética e aumento da rigidez muscular, após contração muscular voluntária ou decorrente à um estímulo elétrico ou mecânico (TSUJINO *et al.*, 2011) e tendem a melhorar com o aumento da osmolaridade extracelular proporcionada pela contração repetitiva do músculo afetado, fenômeno denominado “warm-up” (HOPPE *et al.*, 2019).

Em humanos, a MH possui padrão de herança autossômico dominante, conhecida como doença de Thomsen, e padrão de herança autossômico recessivo, doença de Becker. Neste ultimo, o fenótipo geralmente é mais grave (TRIVEDI *et al.*, 2013).

Miotonia e hipertrofia muscular compõem sintomatologia clássica expressa na MH (MENG *et al.*, 2016). No entanto, o estabelecimento da relação genótipo-fenótipo (IMBRICI *et al.*, 2018) ampliou o espectro de manifestações clínicas para a doença (TRIP *et al.*, 2009), incluindo até mesmo casos cuja sintomatologia é atípica,

a exemplo da oftalmoplegia flutuante observada inicialmente em um caso de miotonia hereditária (ODRZYWOLSKI *et al.*, 2012) ou fraquezas e mialgias episódicas, bem como dor bilateral nas pernas apresentadas como queixas iniciais em pacientes miotônicos (BHANGAV; MANOUSAKIS, 2017).

Estudos sobre o fenótipo da miotonia hereditária em humanos também demonstraram que alguns fatores podem favorecer o início dos sintomas, a exemplo do hipotireoidismo (PASSERI *et al.*, 2014) e da gestação (KUSHLAF; QUINLAN, 2017).

No que se refere ao diagnóstico da MH, o histórico do paciente, o exame físico, descargas miotônicas características observadas no exame de eletromiografia (SENER *et al.*, 2018), avaliação histológica para descarte de alterações distróficas e análises genéticas devem ser realizadas a fim de confirmar mutações no gene *CLCN1* que justifiquem a miotonia (ALEJO-GONZÁLEZ *et al.*, 2016).

É importante destacar que dentre as ferramentas disponíveis para o diagnóstico da MH, o exame de eletromiografia (EMG) constitui-se indispensável para o diagnóstico. A instabilidade elétrica da membrana do sarcolema caracteriza miotonia e pode ser identificada no exame de EMG, apresentando elevada taxa de detecção das típicas descargas miotônicas observadas na canalopatía (DROST *et al.*, 2015).

No exame de EMG cada forma de onda representa um potencial ordinário das fibras musculares, a forma é analisada juntamente com o ritmo de onda e com a força muscular (AKABOSHI, 2018). Traçados eletromiográficos em padrão crescente-decrescente de ondas, como observado na figura abaixo, bem como som que se assemelha ao “motor de motocicleta” (PRESTON; SHAPIRO, 2013) ou “avião de bombardeiro” caracterizam a miotonia hereditária.

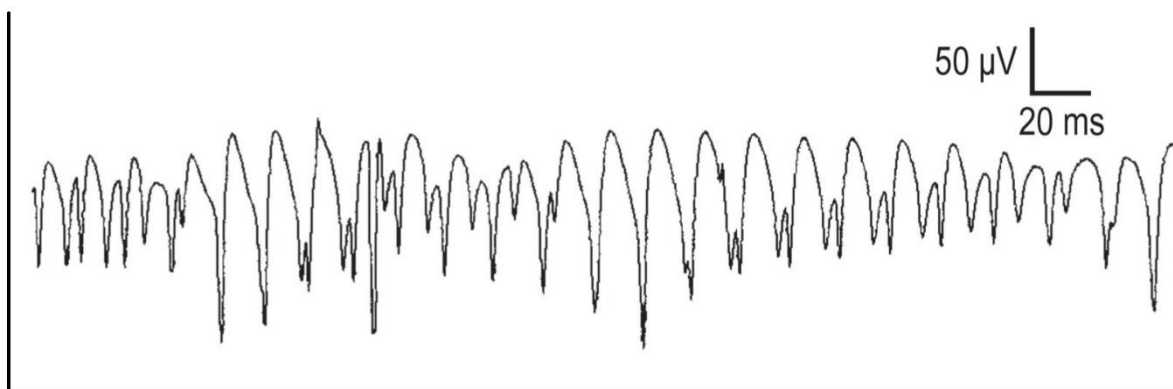


FIGURA 1: Traçados eletromiográficos com aumento e diminuição da amplitude e frequência de ondas, característicos da descarga miotônica presente na miotonia hereditária (Adaptado de PRESTON; SHAPIRO, 2013).

2.2.3. Miotonia Hereditária em Humanos

Em 1876, o Dr. Asmus Julius Thomsen descreveu em vários membros de sua família, e em si mesmo, o relaxamento tardio dos músculos esqueléticos, uma condição hereditária que se manifestava após contração voluntária. Essa consistiu na primeira descrição da miotonia hereditária, existindo variabilidade fenotípica entre os membros afetados da família e redução gradual da miotonia após a repetição de movimentos, denominado efeito “*warm-up*” (THOMSEN, 1876).

Peter Emil Becker, em 1977, descreveu a existência de uma variação da miotonia hereditária estudada por Thomsen, apresentando uma enfermidade de caráter recessivo (BECKER, 1977).

Anos mais tarde, quando a realização de testes genéticos se tornou possível, os fenótipos descritos por Thomsen (GEORGE *et al.*, 1993) e Becker foram associados a mutações no gene do canal de cloreto do músculo esquelético *CLCN1* (KOCH *et al.*, 1992).

Atualmente, mais de duas centenas de mutações no gene *CLCN1* foram descritas, mutações em miotonia hereditária autossômica recessiva, conhecida como doença de Becker (RAJA RAYAN *et al.*, 2012; PORTARO *et al.*, 2015) e miotonia de caráter dominante, doença de Thomsen (FAHLKE *et al.*, 1997; TSUJINO *et al.*, 2011).

Um exemplo da persistência na expressão e variabilidade fenotípica intrafamiliar, observada inicialmente por Thomsen, foi relatado em 16 indivíduos da mesma família, persistindo por cinco gerações (SASAKI *et al.*, 2001). A expressão fenotípica, nesses casos, apresenta-se mais grave em homozigotos que em pacientes heterozigotos, sugerindo efeito de dosagem gênica (RICHARDSON *et al.*, 2014).

Quanto a variabilidade genotípica, embora a predominância do acometimento dos exons 4 e 5 no *CLCN1* tenha sido observada em 106 indivíduos não aparentados (BRUGNONI *et al.*, 2013), a possibilidade de mutações na MH é imensa e novas mutações são frequentemente descritas em humanos (JING *et al.*, 2018), afetando diferentes regiões do gene.

2.2.4. Miotonia Hereditária em Animais

Além da espécie humana (MEYER-KLEINE *et al.*, 1995), búfalos (BORGES *et al.*, 2013), cabras (BECK; FAHLKE, 1996), cães (RHODES *et al.*, 1999; FINNIGAN *et al.*, 2007), camundongos (STEINMEYER *et al.*, 1991; PAPIZAN *et al.*, 2017), cavalos (WIJNBERG *et al.*, 2012), gatos (TOLL *et al.*, 1998; HICKFORD *et al.*, 1998; GASCHEN *et al.*, 2004; GANDOLFI *et al.*, 2014), ovelhas (MONTEAGUDO *et al.*, 2015) e suínos (ARAÚJO *et al.*, 2017) também são afetados pela miotonia hereditária.

2.2.4.1. Cabra: O mais antigo modelo animal da síndrome miotônica

Relatos sugerem que as primeiras cabras com rigidez ao movimento e “ataques” de rigidez surgiram no Tennessee central, por volta de 1880. Inicialmente, os animais acometidos pela miotonia eram descritos como *fainting goats*. Quando um estímulo sonoro alto ou um movimento súbito era aplicado aos animais afetados, a reação aos estímulos era o bastante para exibir a condição caracterizada por contração muscular generalizada, que poderia durar de 5 a 20 segundos, nos casos mais graves (WHITE; PLASKETT, 1904; DZAKUMA; RISCH, 1996).

O modelo animal da cabra permitiu que BRYANT (1969) observasse a baixa condutância do cloreto em fibras musculares de cabras miotônicas como principal fator associado à causa de miotonia.

A compreensão da patogênese da MH se iniciou com os primeiros registros eletromiográficos de cabras miotônicas (BROWN; HARVEY, 1939). Posteriormente, estas também contribuíram para a descoberta da condutância de cloreto diminuída na membrana de fibras musculoesqueléticas em repouso (LIPICKY; BRYAN, 1966; ADRIAN; BRYANT, 1974). O sarcolema afetado pela miotonia hereditária apresenta resistência no processo de repolarização, em decorrência da diminuição da condutância do cloreto (BARCHI, 1975).

A partir deste modelo animal, três explicações foram descritas para o defeito do canal de cloreto na miotonia: bloqueio do canal decorrente de substância oclusiva, diminuição do número de canais e alteração da seletividade para o cloreto (BRYANT, 1982).

As descrições de miotonia não distrófica em caprinos muito contribuíram para o estudo e compreensão da miotonia (LIPICKY *et al.*, 1966). Inicialmente, apenas variações da manifestação clínica eram utilizadas para o diagnóstico (BRYANT *et al.*, 1968). Posteriormente, com a disponibilidade dos estudos moleculares, uma mutação *missense* foi descrita no gene *CLCN1*, caracterizada pela substituição de uma prolina por alanina. Sugere-se que essa mutação tenha sido o único alelo entre as cabras miotônicas no Tennessee (BECK *et al.*, 1996).

2.2.4.2. Miotonia não distrófica em outras espécies animais

No decorrer das últimas décadas várias descrições de miotonia não distróficas surgiram em outras espécies animais. Camundongos, por exemplo, foram relatados como afetados pela miotonia em decorrência de uma inserção de *transposon* no gene que codifica o canal CLC-1 (STEINMEYER *et al.*, 1991). A presença de uma mutação *nonsense* e outra *missense* também foram observadas nessa espécie (GRONEMEIER *et al.*, 1994).

A descrição da MH em um equino foi o primeiro relato da doença em uma espécie diferente da humana e caprina (STEINBERG; BOTELHO, 1962). Outro estudo sobre a miotonia do CLC-1 descreve um potro de sete meses que apresentou decúbito, rigidez generalizada e descargas miotônicas. A análise genética apontou que o animal afetado era homozigoto recessivo para a mutação *missense* c.1775A> C, p.D592A (WIJNBERG *et al.*, 2012).

A primeira descrição da miotonia hereditária em felinos ocorreu em 1998. Quatro filhotes tinham postura rígida ao caminhar, hipertrofia muscular, dificuldade para abrir a boca, espasmos no músculo orbicular do olho e episódios de hiperextensão dos membros seguido de queda no decúbito lateral. As alterações clínicas e presença de descargas miotônicas sugeriram o diagnóstico de MH (HICKFORD *et al.*, 1998).

Na mesma época, rigidez e hipertrofia não dolorosa foram observadas nos músculos apendiculares proximais em dois gatos. O exame de EMG revelou descargas miotônicas clássicas (TOLL *et al.*, 1998).

Recentemente, a ausência dos éxons 15 e 16 do gene *CLCN1* foi relatada em felinos. A mutação resultou em um truncamento prematuro e alteração parcial do domínio *CBS1* (cistationina β -sintase) altamente conservado, crítico para a formação do canal *CLC-1* e atividade de transporte iônico (GANDOLFI *et al.*, 2014).

Ao exame físico, os felinos apresentaram hipertrofia muscular no pescoço e na região proximal dos membros, língua protruída, limitação de movimento mandibular associado à sialorreia, blefaroespasma e rigidez generalizada. Ao exame de EMG, descargas miotônicas audíveis foram observadas e comparadas a um “enxame de abelhas” (GANDOLFI *et al.*, 2014).

Em búfalos da raça Murrah a miotonia foi descrita apresentando hipertrofia e rigidez muscular. Descargas miotônicas estavam presentes no exame de EMG. A análise genética apontou a deleção de 43 nucleotídeos no éxon 3, decorrente de um erro de *splicing*. Esse processo ocasionou uma alteração da estrutura de leitura do gene *CLCN1* para a tradução, resultando em 24 aminoácidos não relacionados e um *stop códon* prematuro (BORGES *et al.*, 2013).

Suínos com hipertrofia, rigidez muscular, fenômeno de “warm-up” e a clássica manifestação de descargas miotônicas na EMG propiciaram a pesquisa molecular e o primeiro relato da miotonia hereditária na espécie. O mecanismo que causou as alterações no canal de *CLC-1* consiste de uma extensa deleção de regiões íntronicas e exônicas, afetando os éxons 15 e 16, que acarretou na ausência de 116 aminoácidos para composição proteica do canal de cloreto (ARAÚJO, 2018).

Em um rebanho de ovinos da raça Rasa Aragonesa a estimulação visual, auditiva ou a rápida movimentação durante o manejo do lote desencadeou crises, em dois animais afetados, caracterizadas por quedas ao solo, postura rígida e extensão dos membros, com duração aproximada de 6 a 25 segundos. Hipertrofia da musculatura dos membros posteriores e atraso no relaxamento muscular foram evidenciados no exame físico. Um nucleotídeo não sinônimo, resultando em substituição p.Gln93Lys, foi identificado no éxon 2 do gene *CLCN1* e associado à miotonia hereditária na espécie (MONTEAGUDO *et al.*, 2015).

2.2.4.3. Miotonia hereditária em cães

Os primeiros relatos de cães afetados pela miotonia hereditária surgiram na década de 80. De acordo com um dos relatos, uma fêmea da raça *Chow Chow*, com quatro meses de idade, apresentava rigidez de membros, ataxia nos membros pélvicos e quedas súbitas, descritas como colapsos ocasionais. Na época, o diagnóstico consistia basicamente na avaliação do histórico, manifestações clínicas, eletrodiagnóstico e exame microscópico de músculo biopsiado para confirmação da ausência de distrofia muscular (AMANN *et al.*, 1985; SHORES *et al.*, 1986).

Posteriormente, descrições da miotonia hereditária foram feitas também em cães das raças *Staffordshire terrier* (SHIRES *et al.*, 1983), *Great Dane* (HONHOLD; SMITH, 1986), *Cocker Spaniel* (HILL, 1995), *Schnauzer Miniatura* (RHODES *et al.*, 1999; VITE *et al.*, 1999), *Rhodesian Ridgeback*, *West Highland White terrier*, *Samoyed cross*, (DEWEY, 2005), *Australian cattle dog* (FINNIGAN *et al.*, 2007), *Jack Russell terrier* (LOBETTI, 2009), *Border Collie* (DONNER, 2016; DEWEY; TALARICO, 2017) e *Labrador Retriever* (QUITT *et al.*, 2018). Mutações no gene *CLCN1*, compatíveis com a miotonia hereditária, foram descritas apenas em cães das raças *Schnauzer Miniatura* (RHODES *et al.*, 1999), *Australian cattle dog* (FINNIGAN *et al.*, 2007), *Jack Russell terrier* (LOBETTI, 2009), *Border Collie* e *Labrador Retriever* (QUITT *et al.*, 2018).

Em um cão macho de quatro meses de idade, da raça *Cocker Spaniel*, as alterações observadas no sistema muscular foram descritas como rigidez, espasticidade, ataxia dos membros e "*bunny hopping*" dos membros pélvicos. O diagnóstico de miotonia hereditária foi baseado nas características clínicas, anormalidades eletrofisiológicas e análises histopatológicas (HILL, 1995).

A raça *Schnauzer* compreende o maior número descrito de cães afetados. VITE *et al.*, (1999) relataram a enfermidade em 17 *Schnauzers* geneticamente relacionados dos quais nove eram afetados. Os cães apresentaram andar enrijecido, principalmente ao iniciar um movimento, e melhora com o exercício. Quedas foram observadas decorrente de rápidas mudanças na postura. Nervos cranianos e reflexos segmentares não estavam alterados. Na raça, a doença manifestou alterações dentárias e craniofaciais associadas à miotonia e rigidez muscular. O exame eletromiográfico dos cães afetados revelou descargas miotônicas com duração aproximada de 40 segundos (GRACIS *et al.*, 2000).

Pesquisas envolvendo a raça *Schnauzer Miniatura* foram as pioneiras em relacionar os sinais clínicos com distúrbios do canal de cloreto e analisar o gene *CLCN1*, colaborando com o desenvolvimento de testes genéticos para investigação de cães portadores de mutações relacionadas com a miotonia hereditária (RHODES *et al.*, 1999; VITE *et al.*, 1999; BHALERAO *et al.*, 2002).

Para a padronização de um teste genético molecular, capaz de detectar mutações do gene *CLCN1*, relacionadas à miotonia hereditária em cães *Schnauzers Miniatura*, 372 cães da raça foram testados entre março de 2000 e outubro de 2001, nos Estados Unidos, Canadá, Europa e Austrália. Um teste de DNA de digestão enzimática de produtos de PCR, amplificados utilizando um único par de iniciadores para a mutação no alelo CLC-1, evidenciou que 20,4% dos animais eram portadores da mutação e 1,1% eram cães afetados pela miotonia. Os achados do teste genético, juntamente com a análise genealógica, permitiram relacionar um reprodutor como ancestral comum de todos os portadores e cães afetados (BHALERAO *et al.*, 2002).

O padrão de herança autossômico recessivo foi observado no *Schnauzer*, assim como no cão da raça *Australian cattle dog* (VITE *et al.*, 1999; FINNIGAN *et al.*, 2007). Uma mutação *missense* em *CLCN1*, c.803C> T resultando em p.T268M, foi associada à miotonia em *Schnauzers* (RHODES *et al.*, 1999; BHALERAO *et al.*, 2002) e também *Jack Russel Terriers* (LOBETTI, 2009).

Na raça *Australian Cattle Dog*, um cão oriundo do Canadá, apresentando hipertrofia e rigidez muscular generalizada, positivo para descargas miotônicas típicas da miotonia hereditária, foi submetido à biopsia muscular para realização de

análise genética. A mutação no gene *CLCN1*, c.2665insA, resultando em perda dos 88 resíduos de aminoácidos C-terminais, foi igualmente observada em cães da raça *Australian cattle dog* e *Border Collie* (FINNIGAN *et al.*, 2007; DONNER *et al.*, 2016).

Em um cão da raça *Jack Russell terrier* de quatro meses de idade, as alterações descritas consistiram em músculos hipertróficos bem definidos nos membros torácicos e pélvicos, espasmos musculares e crises de rigidez generalizada com piora após repouso e mudanças súbitas na direção do movimento. O quadro clínico apresentou melhora com o exercício. Exames laboratoriais de rotina e o exame neurológico não revelaram anormalidades. A mutação *missense* em *CLCN1*, c.803C> T relacionada a alterações no canal iônico de cloreto colaborou para o diagnóstico de miotonia hereditária (LOBETTI, 2009).

O estudo mais recente da doença descreveu a miotonia em um Labrador Retriever com dois meses de idade. Além dos típicos episódios de distúrbios do movimento, resultantes da rigidez generalizada, com piora após repouso e melhora com a atividade prolongada, o cão apresentou disfagia orofaríngea e estridor de vias aéreas superiores, induzido por excitação. No exame de eletromiografia, descargas miotônicas abundantes foram observadas. A análise histológica permitiu exclusão de miopatias estruturais. Através do sequenciamento do gene *CLCN1*, a mutação c.2275A> T foi identificada, juntamente com o codon prematuro p.R759X (QUITT *et al.*, 2018).

2.3. American Bulldog: Características da raça

A raça teve origem na Inglaterra e foi criada para ser um “*farm utility dog*”, utilizado no trabalho da fazenda, proteção pessoal e patrimonial (National Kennel Club, 2019). Por se tratar de cães fortes, corajosos e com familiaridade com o gado, tornaram-se populares no *bullbaiting*, um esporte sangrento que consistia no combate entre cães e touros, um touro era preso e dois ou mais cães eram soltos sobre ele até derrubá-lo. Quando o esporte foi proibido, a raça praticamente desapareceu, sendo substituída pelo Bulldog Inglês. No entanto, imigrantes levaram seus cães de trabalho para o sul dos Estados Unidos e quando os *American Bulldog* estavam quase extintos, na década de 1950, John D. Johnson, juntamente com Alan Scott se dedicaram a criar a raça e descreveram dois padrões raciais clássicos (UKC - United Kennel Club, 2019).

Existem três variações da raça: o tipo Bully ou Clássico, também conhecido como tipo Johnson, o tipo Padrão ou Desempenho, também chamado de tipo Scott, e híbridos dos dois (ABKC - American Bully Kennel Club, 2019).

Os cães tipo Johnson apresentam maior massa muscular, com cabeças maiores, focinho mais curto e mordida mais pronunciada que os cães do tipo Scott. Atualmente, muitos *American Bulldogs* são híbridos, resultante de cruzamentos para as duas linhas originais (UKC - United Kennel Club, 2019). Cães American Bully possuem pelagem curta, são ágeis, musculosos e robustos. Cães machos são maiores e mais pesados que fêmeas. No que se refere ao temperamento, são alertas, extrovertidos e confiantes (National Kennel Club, 2019).

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral:

O presente estudo teve como principal objetivo descrever os aspectos clínicos, eletromiográficos e moleculares da Miotonia Hereditária em cães da raça *American Bulldog*.

3.2. Objetivos específicos:

Confirmar a miotonia hereditária no cão que apresenta hipertrofia muscular.

Descrever os achados eletromiográficos e histopatológicos na enfermidade miotônica envolvendo cães da raça *American Bulldog*.

Construir heredograma para determinar padrão de herança.

Sequenciar o RNAm responsável pela codificação do canal de cloreto na musculatura esquelética de um cão normal e de um cão afetado.

Identificar e localizar a possível mutação responsável pela enfermidade miotônica no gene *CLCN1*.

Padronizar um teste molecular diagnóstico para o tipo de mutação envolvida.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Animais experimentais

Este estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP), Campus Botucatu (CEUA 0173/2018 - Anexo A). Consentimento esclarecido para uso dos animais na pesquisa foram fornecidos pelos tutores.

Um cão da raça *American Bulldog*, identificado como número 1, macho, não castrado, aos cinco meses de idade, foi inicialmente atendido pelo Serviço de Neurologia Veterinária do Hospital Veterinário da Escola de Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal de Goiás (HV/EVZ/UFG), Campus Samambaia, Goiânia, Goiás, Brasil.

Diante da suspeita clínica de miotonia hereditária, o Laboratório de Biologia Molecular do Departamento de Clínica Veterinária, da FMVZ - UNESP, Campus Botucatu, São Paulo, Brasil, foi contatado para contribuir com o caso, através da avaliação neuromuscular, eletromiográfica e molecular.

Amostras de sangue de dez cães vinculados ao cão número 1 por correlação genética, atestada através das informações dispostas no Pedigree Database, foram colhidas para análise genética. As amostras têm por origem as regiões Sudeste e Centro-Oeste do Brasil e correspondem aos estados de Goiás, Minas Gerais e Rio de Janeiro.

A identificação das amostras procedeu com a sequência dos números: 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11. As amostras número 2 e 3 correspondem, respectivamente, ao pai e a mãe do cão número 1. A tia materna corresponde ao número 4. Os números 5, 6, 7 e 8 são irmãos, sendo que 5 e 6 são meio irmãos e apenas a número 7 é irmã de mesma ninhada. A amostra número 9 é da sobrinha. Por fim, os números 10 e 11 correspondem a cães cujo avô é um ancestral comum (FIGURA 2).

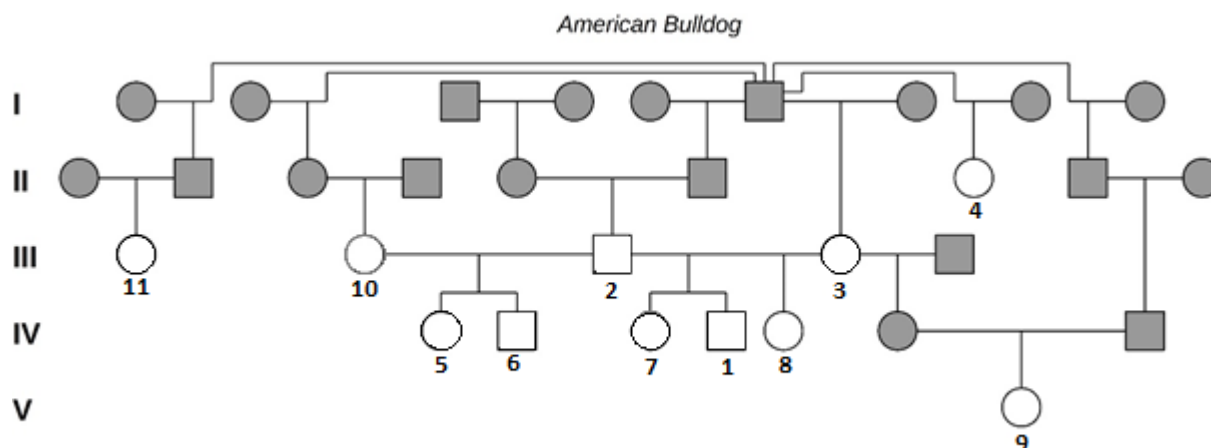


FIGURA 2: Heredograma com identificação das amostras e grau de parentesco dos dez cães vinculados ao cão número 1. As formas não hachuradas correspondem as amostras disponibilizadas para o estudo. Cães machos foram representados pelos quadrados e fêmeas por círculos. As amostras correspondem ao pai (2),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

Adicionalmente, foram obtidas amostras de sangue de cães, da raça *American Bulldog*, oriundos dos estados de São Paulo, Minas Gerais e Goiás. Ao todo 33 amostras de cães sem parentesco com o cão número 1, até quinto grau, destinadas a testes genéticos foram identificadas com a sequência de números: (12-44).

Quatro amostras foram obtidas no estado de Goiás; uma amostra no estado de Minas Gerais e 28 amostras foram coletadas em diferentes municípios do estado de São Paulo.

4.2. Exame físico, exame de EMG e histopatológico

A obtenção de informações a respeito do histórico familiar do paciente, obtida através do relato do responsável pelo cão, evidenciou a existência de uma irmã de mesma ninhada que apresentava sinais clínicos semelhantes. Não foi possível examiná-la, mas a análise de vídeo e imagens confirmaram a presença de hipertrofia do pescoço e região proximal dos membros, além disto, ao ser exercitada apresentava episódio de rigidez muscular de curta duração que melhorava após exercício.

O exame de eletromiografia foi realizado, no cão 1, nas dependências do Hospital Veterinário da Escola de Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal de Goiás. O equipamento utilizado para a avaliação eletromiográfica foi o eletroneuromiógrafo (Neuromap® ENMG/PE, Neurotec®, Itajubá, MG, Brasil).

O exame de eletromiografia foi realizado apenas no animal cujas manifestações clínicas sugeriam diagnóstico de miotonia hereditária, em dois momentos: antes do procedimento de biópsia muscular e após o procedimento, durante a recuperação anestésica. Para realização do exame, que visa avaliar o paciente em repouso, o cão foi mantido em decúbito lateral ou em posição quadrupedal. Com o uso de eletrodos de agulha, os músculos proximais dos membros pélvicos e torácicos foram avaliados e um traçado eletromiográfico, obtido. No segundo exame de EMG, realizado durante a recuperação anestésica, os mesmos músculos e também a língua foram avaliadas. Analisou-se o traçado quanto a forma de onda, frequência e amplitude e som produzido.

O cão foi submetido a biópsia muscular e coleta de sangue, a fim de obtenção de amostras para extração de RNA, a partir do músculo, e DNA, a partir de sangue. Ambas as amostras permitem identificação de possíveis alterações que justifiquem os achados de manifestações clínicas sugestivas de miotonia hereditária.

Para a análise histopatológica, amostras de músculo esquelético do primeiro cão em estudo foram acondicionadas em formol à 10% e posteriormente submetidas ao corte histológico. Após procedimento envolvendo o uso de parafina, cortes com 6 a 8 µm permitiram a confecção de lâminas coradas com hematoxilina e eosina. O material obtido foi analisado, subjetivamente, quanto a alterações morfológicas e presença de processos degenerativos ou necróticos.

4.3. Colheita das amostras experimentais

4.3.1. Amostras de sangue

Uma amostra de sangue total de aproximadamente 3mL, referente ao cão 1, foi acondicionada em tubo com EDTA, e refrigerada, para posterior extração de DNA.

Amostras de sangue de dez cães geneticamente relacionados com o primeiro cão do estudo, dentre eles irmãos, pai, mãe, tia, sobrinha e cães com o avô em

comum, foram também obtidas, acondicionadas em tubo contendo EDTA e refrigeradas para posterior extração de DNA e processamento das análises. Outros 33 cães, sem parentesco com o cão 1, foram submetidos a colheita de amostra de sangue venoso para extração de DNA e realização de testes genéticos. O procedimento consistiu na colheita de 1 a 2 mL de sangue venoso, utilizando agulha 21G após assepsia do local de punção com algodão e álcool, e o acondicionamento da amostra em tubo estéril com anticoagulante EDTA, em sequência a amostra foi refrigerada a 4°C.

4.3.2. Biópsia Muscular

O procedimento de biópsia incisional foi realizado no Centro Cirúrgico de Pequenos Animais do Hospital Veterinário da Universidade Federal de Goiás (UFG), apenas no cão que apresenta distúrbios de contração muscular, visando obtenção de amostra para realização de exame histológico e molecular, a fim de confirmar a suspeita diagnóstica.

O planejamento anestésico consistiu no uso de 2µg/kg de fentanil e 5mg/kg de propofol para indução anestésica e manutenção com isoflurano a 2,5 V%, sob ventilação intermitente sincronizada. O paciente foi posicionado em decúbito lateral e procedeu-se a tricotomia na região lateral distal do úmero e antissepsia com clorexidina degermante e alcoólica. Sobre a porção escapular do músculo deltóide, uma abordagem de aproximadamente 3 cm foi suficiente para permitir a biópsia muscular, após incisão cutânea e divulsão dos tecidos subadjacentes retirou-se um fragmento com dimensões próximas a 2,0 x 1,0 x 0,5cm (comprimento, profundidade e largura). Após a retirada da amostra de músculo, efetuou-se a dermorrafia com fio de náilon 3-0, em padrão Wolff.

As amostras foram acondicionadas em criotubos contendo formalina tamponada a 10% e criotubos com solução de estabilização de RNA (RNAlater tissue collection, Invitrogen™, Waltham, MA, USA), visando as análises histológicas e teste genético para o gene *CLCN1*, respectivamente. Os tubos foram imersos em nitrogênio líquido para posterior envio às análises. Após a extração de RNA, as amostras foram armazenadas em freezer próprio para o material biológico, a -80°C.

4.4. Avaliação do gene *CLCN1*

4.4.1. Extração de DNA

Para extração de DNA das amostras de sangue total, fez-se utilização do illustra™ blood genomic Prep MiniSpin Kit, seguindo instruções do fabricante. A pureza (A260/280) e concentração do DNA foram testados no NanoDrop® 2000 spectrophotometer (Thermo Scientific™) e logo em seguida as amostras, quando aceitáveis foram armazenadas em freezer para a conservação do material, a -20°C.

Inicialmente, duas amostras de DNA foram obtidas a partir de amostras de sangue de um cão clinicamente normal e do cão afetado e receberam as respectivas identificações: *wildtype* e 1. Em seguida, amostras de DNA foram extraídas de outros 43 cães e identificadas com a sequência de números 2 ao 44.

4.4.2. Purificação do RNA e confecção do cDNA

Oteve-se amostra de músculo de dois cães para que a amostra de cDNA fosse confeccionada a partir do RNA extraído. A amostra do cão 1 foi colhida por biópsia muscular, enquanto um fragmento de músculo de um cão clinicamente normal, *wildtype* sem sinais de miotonia, foi gentilmente cedido pela Patologia Veterinária, da UNESP - Campus Botucatu. O cão *wildtype* não possuía anormalidade genética, foi encaminhado à Patologia Veterinária já em óbito e a amostra foi colhida logo após a morte.

Para extração do RNA total das amostras, utilizou-se o kit de extração RNeasy® Mini Kit (Qiagen®, EUA), de acordo com as recomendações do fabricante. Em seguida, a análise de espectrofotometria realizada no aparelho Nanodrop™ (Thermo Scientific™, EUA) permitiu avaliação da pureza e concentração das amostras, consideradas aceitáveis as amostras cuja razão entre os valores de absorbância foi aproximadamente 1,8.

Posteriormente, as amostras viáveis foram tratadas com a enzima RQ1 RNase-FreeDNase (Promega®, EUA) para eliminação de DNA genômico residual, e novamente a amostra foi submetida à mensuração de pureza e concentração, no espectrofotômetro.

O próximo passo consistiu na confecção da fita complementar de DNA (cDNA), um volume final de 45 µL, seguindo as recomendações do fabricante, a partir de 500 ng de RNA, “*random primers*” e a enzima Improm-II™ RT (Promega®, EUA).

No término do processo, duas amostras de cDNA foram obtidas, identificadas e armazenadas a -20°C, sendo uma correspondente à pesquisa do gene *CLCN1* do cão *wildtype* e outra do miotônico.

4.4.3. Sequenciamento do RNAm do gene *CLCN1*

4.4.3.1. Primers

Para que todos os éxons do gene *CLCN1*, codificadores dos canais de cloreto da musculatura esquelética, fossem sequenciados a partir da amostra do animal clinicamente normal, bem como de um cão afetado, pares de *primers* foram desenhados ao longo da sequência codificante de RNAm do *CLCN1*, utilizando a base de dados disponível no *Ensembl: chloride voltage-gated channel 1* NC_006598.3 (NM_001003124.2), visando cobertura total dos 23 éxons.

Oito pares de *primers*, *Forward* e *Reverse*, descritos na TABELA 3, permitiram cobertura total dos exons codificantes, a partir de amostra de cDNA, a fim de comparação entre os genes *CLCN1* do cão *wildtype* e do cão miotônico com o gene referência disposto no *GenBank*™. Posteriormente, diante da dificuldade de obtenção de um bom produto resultante das regiões éxon 6 e éxon 7, a partir de amostra de cDNA do cão miotônico, outro par de *primer* foi desenhado para sequenciamento da região. O novo *primer* foi identificado como I6, conforme tabela abaixo:

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

IDENTIFICAÇÃO DO PRIMER	PRIMER (5'-3')	TAMANHO DO PRODUTO A SER AMPLIFICADO	ABRANGÊNCIA
F1	AGGCTTAAGGAGCTGTATTGGG	536	Éxon 1, 2, 3
R1	GTTGGGCTGCATCTGGTAGT		e parte do éxon 4
F2	GGAGCATGGATTATGTCAGTGC	504	Éxon 4, 5, 6 e 7
R2	TCCGCACAGCAAAGTATGTA		
F3	TGTGCTGTAGGAGTTGGCTG	476	Éxon 8, 9, 10 e 11
R3	TCGAATAGGGTGCTGATGGC		
F4	CGCCTGCTGTATCCTGGAAT	498	Éxon 12, 13 e 14
R4	GTGGGCAATCTGACCCGTTA		
F5	AGGCTATGCGGTAATTGGGG	510	Éxon 15, 16
R5	TGGTGTCCCTTCCCATCGTA		e parte do éxon 17
F6	GAGCGCTCAGAGCTACAGTC	496	Éxon 17, éxon 18, 19 e 20
R6	GGTCGATGCAGCAGTAGTCA		
F7	GGATTTAGTGGACAACATGTCACC	574	Éxon 21, 22 e 23
R7	GAGGACGAGCTGATTCTTTGA		
F8	TCCCTTGCTCTCTGAGGCT	480	Éxon 23 e UTR
R8	TGCCGGAACAAGAAGACCAA		
I6 (Forward)	GCCCTTTCGTCCACATCGC	156	Éxon 6 e Éxon 7 (cDNA)
I6 (Reverse)	CTCCAAGTGGCGTCCCAAAA		

4.4.3.2. Reação em Cadeia da Polimerase

As amostras obtidas e os *primers* foram submetidos à Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). Para realização de cada PCR, o volume final de 25 µl foi obtido, sendo a composição da reação: 9,5 µl de *nuclease free water*; 12,5 do mix enzima *GoTaq Green*; 0,5 µl do *primer Forward*; 0,5 µl do *primer Reverse*; e 2 µl da amostra. A PCR foi realizada em termociclador *Mastercycler*® PRO SERIES (*Eppendorf*). As condições de termociclagem foram: desnaturação inicial de 95°C por 2 min., 40 ciclos de desnaturação a 95°C por 30 segundos, anelamento a 60°C por 30 seg., extensão a 72°C por 50 seg., seguido por extensão a 72°C por 5 min.

4.4.3.3. Gel de Eletroforese

Objetivando confirmar se o produto esperado foi adequadamente amplificado na etapa anterior, o produto de PCR foi submetido à eletroforese em gel de agarose.

A fonte *Kasvi* de eletroforese foi utilizada, de acordo com recomendação do fabricante, para geração de corrente elétrica, com uso em cubas *Major Science Maior* e *Major Science Menor*.

Para visualização dos produtos em gel de agarose, fez-se uso do transiluminador UV para eletroforese e imagens do gel foram obtidas.

4.4.4. Genotipagem

4.4.4.1. Purificação do DNA

Para o procedimento de purificação dos produtos de PCR, o *Kit Wizard SV Gel and PCR Clean-UP System* (Promega) foi utilizado, seguindo recomendações do fabricante.

Os produtos de purificação, com volume final de 50 µl, foram novamente submetidos à confirmação da presença do material genético esperado, através da eletroforese. O material genético purificado foi então adicionado ao seu respectivo *primer forward* ou *reverse*, no volume final de 15 µl, sendo 10 µl do material purificado e 5 µl de *primer* e então enviado para realização do sequenciamento Sanger.

4.4.4.2. Sequenciamento gênico

A cobertura total da região codificante do RNAm, no cão *wildtype* e no cão 1, foram realizadas através do sequenciamento genético, a partir das amostras de cDNA. As amostras de DNA do cão 1 e do cão *wildtype* foram submetidas a análise da porção final do exon 3 (a partir do 96º pb) e inicial do exon 4 (a partir do 15º pb). As amostras de DNA dos cães geneticamente relacionados com o cão 1 e dos 33 cães clinicamente normais foram utilizadas para amplificação e sequenciamento da região de interesse no gene, compreendendo regiões de porção final de exon 3, íntron 3 e porção inicial de exon 4.

O sequenciador automático de DNA (Sanger), Modelo ABI 3500 (*Applied Biosystems*) foi utilizado pelo Instituto de Biotecnologia da Universidade Estadual Paulista, Campus de Botucatu, para realização do sequenciamento.

As sequências obtidas foram analisadas quanto a qualidade, tamanho dos produtos obtidos e comparadas com a sequência *CLCN1 Canis familiaris*, utilizando a sequência NM_001003124.2 para cDNA e a sequência referência NC_006598.3 para DNA. Para alinhamento e análise das sequências resultantes do sequenciamento, os programas *Geneious prime* e *Sequencher DNA Sequence Analysis* foram utilizados.

4.5. Análise dos Dados

Os *softwares* de análise de sequenciamentos, *Geneious prime* e *Sequencher DNA Sequence Analysis*, foram utilizados para conferência, alinhamento e comparação dos genes *CLCN1* de todos os cães submetidos a pesquisa com a sequência referência NM_001003124.2.

A conferência dos materiais genéticos foi realizada por comparação em cada par de base. As comparações dos produtos sequenciados permitiram a interpretação dos resultados.

5. RESULTADOS

5.1. Exame físico

Durante o exame físico do animal 1, constatou-se parâmetros de normalidade no sistema gastrointestinal, genitourinário, respiratório e cardiovascular. No exame neurológico, o nível de consciência, nervos cranianos, reações posturais e reflexos espinhais também não apresentaram alterações.

Os sinais clínicos apresentados pelo paciente foram hipertrofia muscular, rigidez ao andar e, quando estimulado a atividades físicas, apresentava rigidez muscular que levava a quedas (*startle response*) que o mantinha em decúbito durante alguns segundos. A miotonia apresentou melhora com a repetição do movimento, fenômeno *warm up*.

A miotonia hereditária foi o diagnóstico presuntivo do cão 1. O cão apresentava hipertonia muscular generalizada sem envolvimento do sistema nervoso. Foram observadas hipertrofia muscular pronunciada na região proximal dos membros torácicos, pélvicos e pescoço, como observado na Figura 3. As manifestações clínicas citadas estão presentes desde os 45 dias de idade.



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

5.2. Eletromiografia e Histopatologia

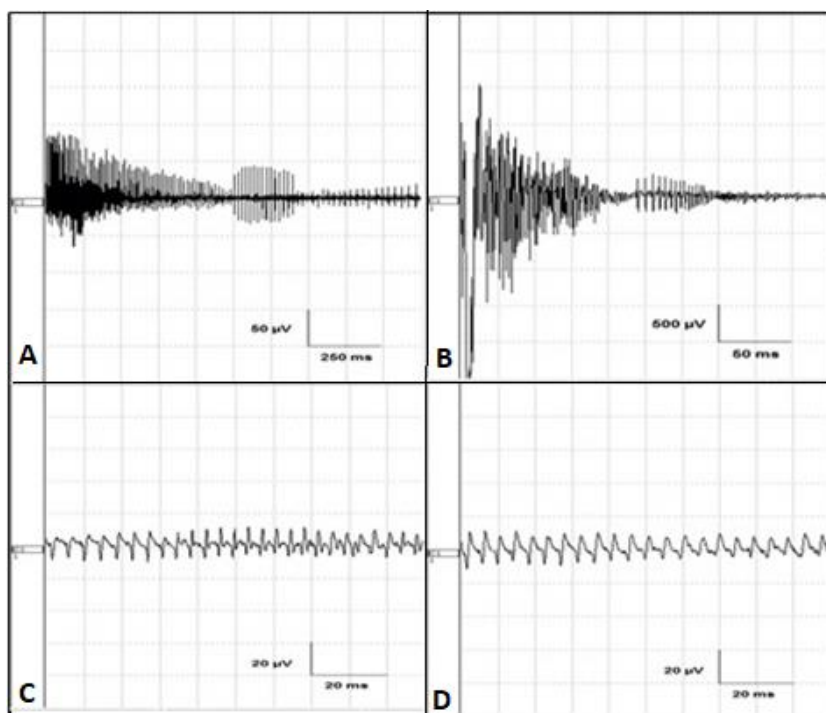


FIGURA 4: Traçados eletromiográficos em padrão crescente-decrescente de ondas, característicos de miotonia hereditária. Os eixos verticais representam a intensidade (μV) e os eixos horizontais correspondem a medida de tempo (ms/div). **A - B.** Descargas miotônicas são observadas com o aumento e diminuição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

O exame de eletromiografia realizado no cão 1 indicou traçados eletromiográficos em padrão crescente-decrescente (descargas miotônicas) de ondas e som semelhante a um “motor de motocicleta”, “avião de bombardeiro”, característicos da miotonia. Os achados se repetiram nos diferentes locais de inserção da agulha e nos diferentes tempos de realização do exame (Figura 4).

Na avaliação histopatológica do tecido muscular do cão miotônico, não foram constatadas alterações distróficas, apenas hipertrofia das fibras. A ausência de alterações adicionais sugeriu padrão de normalidade das fibras musculares. A distribuição das fibras foi homogênea com núcleo periférico e tecido conjuntivo normalmente distribuído.

5.3. Sequenciamento do RNAm do *CLCN1*

Ao se comparar a sequência do RNAm do *Canis lupus familiaris chloride voltage-gated channel 1 (CLCN1)* obtida de amostra de músculo do cão *wildtype* com a sequência do RNAm NM_001003124.2, depositado no GeneBank™(NC_006598.3) observou-se a presença de três polimorfismos sinônimos (exóns 1, 6 e 23), i.e.; c.72C>T - 24TAC>ATC (Tirosina); c. 714T>C - 238ATT>ATC (Isoleucina) e c.2709 T>C - 903AGT>AGC (Serina). A comparação da sequência obtida a partir de amostra de músculo do cão miotônico com a do cão *wildtype* e a NM_001003124.2 resultou na presença dos mesmos polimorfismos observados no cão *wildtype*.

No animal miotônico foi observado a inserção de quatro nucleotídeos (CTCT) no início do éxon 4, logo após o 3^apb do éxon (NM_001003124.2: c.436_437insCTCT) (Figura 5). Essa inserção alterou a sequência de leitura do RNAm, provocando a formação de um *stop códon* prematuro (M194X).

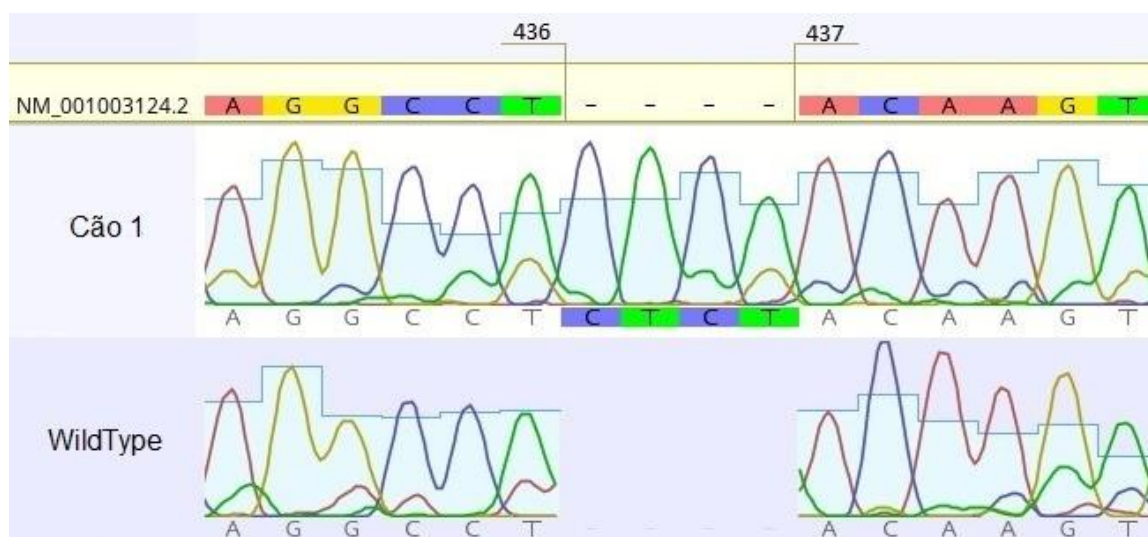


FIGURA 5: Localização da mutação NM_001003124.2: c.436_437insCTCT no cão afetado pela miotonia hereditária, em comparação ao gene referência e ao cão controle negativo.

A mutação NM_001003124.2: c.436_437insCTCT implica na inserção de um aminoácido p.Y145S e alteração da localização de vários aminoácidos subsequentes, resultando em um *stop códon* prematuro p.M194X (Anexo B).

Para análise do impacto da mutação sobre a estrutura protéica, a sequência proteica do animal miotônico foi predita a partir da sequência codificante

(Myotonic_dog_CLC1) e alinhada com a sequência da proteína CLC-1 humana (Human_6QVC). Na sequência Myotonic_dog_CLC1 foram observados resíduos conservados, *stop códon* prematuro (M194X) e os principais aminoácidos que participam da formação do poro condutor seletivo para o íon Cl⁻ (S189, E232 e Y578). Em S189 ocorre uma substituição do resíduo de Serina (S) por um resíduo de Triptofano (W) e a ausência de E232 e Y578 (Figura 6).

FIGURA 6: Alinhamento da sequência da proteína CLC-1 humana (Human_6QVC) e a sequência proteica predita a partir da sequência codificante do animal miotônico (Myotonic_dog_CLC1). Estruturas secundárias são indicadas acima do aminoácido sequência. As hélices alfas foram nomeadas de acordo com a estrutura cristalográfica de raios-x proposta por FENG et al. (2010), resíduos conservados são ressaltados em preto. As barras amarelas representam diferentes aminoácidos a partir do ponto de inserção (NM_001003124.2: c.436_437insCTCT). O asterisco ressaltado em vermelho representa o stop códon prematuro formado (M194X). Em verde estão representados os principais aminoácidos que participam da formação do poro condutor seletivo para o íon Cl^- (S189, E232 e Y578). Na sequência Myotonic_dog_CLC1 em S189 ocorre uma substituição do resíduo de Serina (S) por um resíduo de Triptofano (W) e a ausência de E232 e Y578.

Os produtos correspondentes às amostras de RNAm do cão 1, quando amplificados a partir dos *primers* F2R2 e I6 apresentaram banda dupla, mesmo após repetidas reações de PCR. A PCR realizada com amostras de cDNA do cão miotônico, utilizando o par de *primer* F2R2, os quais flanqueiam as regiões de éxon 4, 5, 6 e 7, resultou na presença de banda dupla em gel de agarose (Figura 7). Um produto de 500 pb e outro de aproximadamente 600 pb foram observados no produto de PCR do cão afetado. No cão *wildtype*, submetido as mesmas condições de PCR, ocorre apenas o produto do tamanho aproximado de 500 pb.

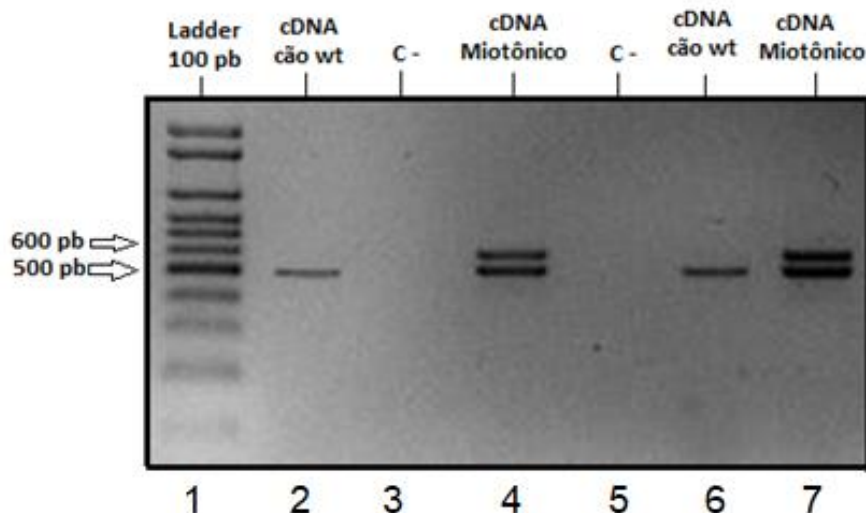


FIGURA 7: Gel de agarose com produtos de PCR das amostras de cDNA *wildtype* e Miotônico, abrangendo as regiões do gene correspondentes aos éxons 4,5,6 e 7. A banda dupla com produtos de aproximadamente 500 e 600 pb é observada apenas no cDNA do cão miotônico. A coluna 1 corresponde ao *ladder* de 100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

Diante da persistência da banda dupla, as bandas foram individualmente recortadas para sequenciamento, a fim de possibilitar adequada análise da região correspondente ao gene *CLCN1* do cão miotônico. O produto de 500 pb observado no gel com a amostra do cão miotônico, mostrou-se semelhante ao observado no cão *wildtype*. O produto de aproximadamente 600 pb, observado apenas no cão miotônico, diferiu no acréscimo de 79 nucleotídeos “ACCGCGTCTGGGCAGCTTGATCTCCTGGTGTCTGGCCTGCGCGGTGGGCGTGGGATGCTGCTTTGCAGCCCCTGTCTGGAG”. Na sequência de nucleotídeos do animal *wildtype* e na sequência NC_006598.3, esses 79 nucleotídeos são encontrados na região central do íntron 6 (FIGURA 8), na posição 6442_6520. No animal miotônico esses 79 nucleotídeos foram inseridos na junção éxon 6 e éxon 7 (FIGURA 9) no produto transcrito de RNAm. Desta forma, constatou-se a presença de um transcrito alternativo NC_006598.3 (NM_001003124.2): c.774_775ins [6442_6520]. Foi realizada PCR a partir da amostra de cDNA do animal miotônico e do cão *wildtype*, utilizando o par de *primer* I6. O produto resultante dessa nova PCR foi de 156 pb para o cão *wildtype*. Para o cão miotônico, as bandas possuíam os tamanhos de 156 e 235 pb.



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

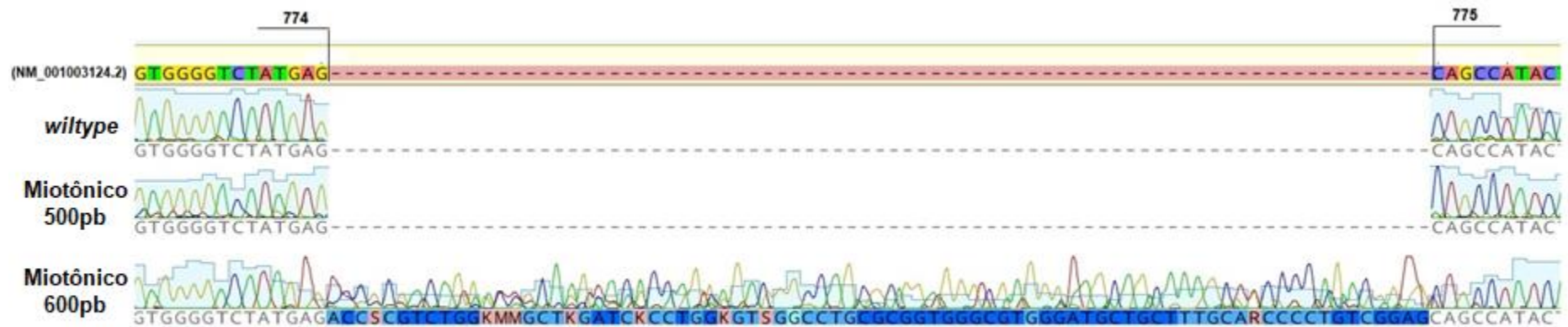


FIGURA 9: Região de junções éxon 6 e éxon 7 obtidas através do alinhamento das sequências NM_001003124.2, RNAm de cão *wildtype* e cão miotônico. No RNAm do cão miotônico, 79 nucleotídeos “ACCGCGTCTGGGCAGCTTGATCTCCTGGTGTCTGGCCTGCGCGGTGGGCGTGGGATGCTGCTTTGCAGCCCCTGTCGGAG” foram inseridos na junção éxon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

5.4. Genotipagem de *American Bulldogs* aparentados com o cão afetado

Para sequenciamento das amostras de DNA oriundas dos cães que possuem vínculo genético com o cão 1, os *primers* escolhidos foram o *Forward 2* (F2) e *reverse 1* (R1), resultando em um produto de aproximadamente 600 pb no gel de agarose submetido a eletroforese. O *primer Forward 2* (F2) foi o que resultou em melhores produtos amplificados e sequenciados. O resultado do sequenciamento Sanger possibilitou análise da região inicial do éxon 4, permitindo identificar se os cães são *wildtype*, heterozigotos ou homozigotos para a mutação NM_001003124.2:c.436_437insCTCT.

A ausência de inserção das bases “CTCT” e de picos duplos de ondas no eletroferograma indicaram a tia (4), um cão cujo avô é um ancestral comum (10), a sobrinha (9) e a irmã de mesmo pai e mãe, mas de ninhada diferente (8), como cães não afetados e não portadores da mutação.

Os pais do cão miotônico, 2 e 3, assim como os meio irmãos, 5 e 6, e também a 11, cujo avô é um ancestral comum, são heterozigotos para a mutação, conforme segue na figura 10. Os picos duplos observados no eletroferograma de dois cães heterozigotos estão ilustrados na figura 11. Por fim, o cão número 7, irmã de mesma ninhada, também apresentou homozigose para a mutação NM_001003124.2:c.436_437insCTCT.

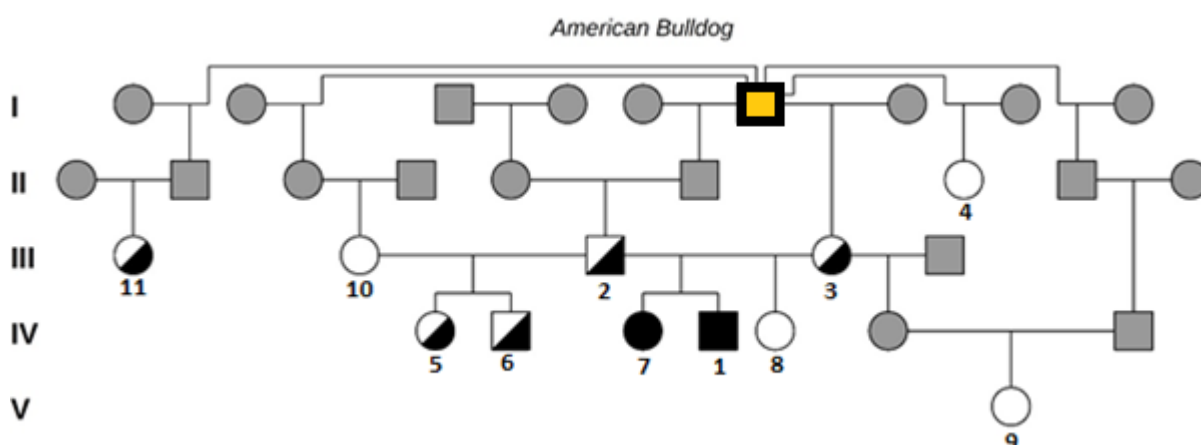


FIGURA 10: Heredograma da família do cão American Bulldog afetado pela miotonia hereditária. As formas não hachuradas correspondem as amostras disponibilizadas para o estudo. Cães machos foram representados pelos quadrados

e fêmeas por círculos. As formas completamente preenchidas são dos animais miotônicos. Os quadrados ou círculos parcialmente preenchidos são de cães heterozigotos para a mutação NM_001003124.2: c.436_437insCTCT. A forma preenchida com a cor amarela corresponde ao ancestral comum dos cães cujas amostras foram analisadas. As formas vazias correspondem a cães *wildtype*.

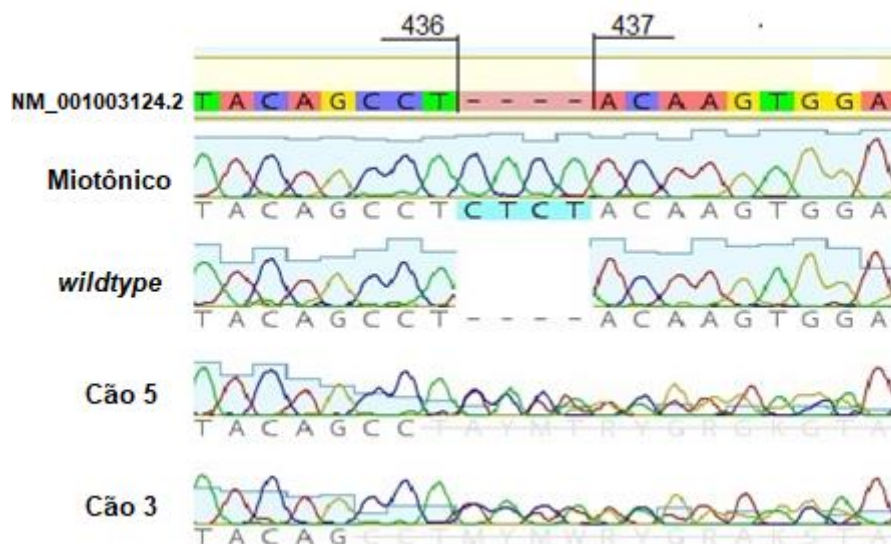


FIGURA 11: Eletroferograma do cão miotônico, recessivo para a mutação NM_001003124.2: c.436_437insCTCT, e do cão *wildtype* em comparação a dois cães heterozigotos para a mutação: Cão 5 (irmã) e Cão 3 (mãe). Picos duplos são observados apenas no eletroferograma dos cães heterozigotos.

5.5. Genotipagem de amostras de cães da raça *American Bulldog*

A genotipagem dos 33 cães não relacionados à família do cão 1, revelou que os 33 cães eram *wildtype* para a mutação NM_001003124.2: c.436_437insCTCT.

Após análise dos resultados de sequenciamento, conclui-se que nenhum dos cães carrega alelos para a mutação, não havendo afetados ou heterozigotos para a mutação descrita.

6. DISCUSSÃO

Uma enfermidade muscular de início precoce foi observada em um cão da raça *American Bulldog*. Os sinais clínicos tiveram início aos 45 dias de idade. Uma irmã de mesma ninhada apresentou alterações musculares similares, os progenitores não eram afetados. Desta forma, a anamnese e a descrição do histórico familiar determinaram a caracterização de uma doença muscular hereditária com padrão de herança autossômico recessivo (BAROHN; DIMACHKIE; JACKSON, 2014).

Hipertrofia muscular generalizada, proeminente no pescoço e região proximal dos membros, e miotonia associada ao fenômeno “*warm-up*” corroboraram com o diagnóstico de miotonia hereditária (ALEJO-GONZÁLEZ *et al.*, 2016; MENG *et al.*, 2016; SENER *et al.*, 2018). Os achados descritos coincidem com os sintomas sugestivos de miotonia hereditária de caráter recessivo em humanos (RAJA RAYAN *et al.*, 2012; PORTARO *et al.*, 2015) e com os sinais clínicos sugestivos da doença em diversas espécies animais (LIPICKY *et al.*, 1966; RHODES *et al.*, 1999; WIJNBERG *et al.*, 2012; BORGES *et al.*, 2013; GANDOLFI *et al.*, 2014; MONTEAGUDO *et al.*, 2015; PAPIZAN *et al.*, 2017), bem como em diferentes raças de cães (SHIRES *et al.*, 1983; HFILL, 1995; RHODES *et al.*, 1999; VITE *et al.*, 1999; FINNIGAN *et al.*, 2007; LOBETTI, 2009; QUITT *et al.*, 2018).

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

Assim como verificado no presente estudo, o aparecimento dos sinais clínicos nos primeiros meses de vida foi observado nas raças *Chow Chow* (AMANN *et al.*, 1985), *Cocker Spaniel* (HILL, 1995), *Jack Russell terrier* (LOBETTI, 2009) e *Labrador Retriever* (QUITT *et al.*, 2018).

No presente estudo, distúrbios do canal iônico do músculo esquelético associados a alteração da excitabilidade da membrana sarcolemal, ausência de distrofia, ausência de fraqueza progressiva e alterações sistêmicas, caracterizam as miotonias não distróficas. Disfunções dos canais de cloreto sugerem miotonia hereditária, disfunções dos canais de sódio do músculo esquelético incluem paramiotonia congênita, paralisia periódica hipercálemica e demais miotonias do canal de sódio (MATTHEWS *et al.*, 2010).

O fenômeno *warm up*, presente no cão miotônico, juntamente com as demais alterações descritas, ocorre na disfunção do canal de cloreto. O fenômeno observado resulta da osmolaridade extracelular aumentada e da sustentação da despolarização da membrana, em decorrência da contração repetitiva do músculo afetado (HOPPE *et al.*, 2019).

Os resultados do exame de EMG do cão miotônico, realizado no presente estudo, corroboram com o padrão clássico de descargas miotônicas, evidenciadas pelo padrão “crescente-decrescente” de ondas, bem como pelo som semelhante a um “motor de motocicleta” ou “avião de bombardeiro”, descritas por PRESTON; SHAPIRO (2013) e GANDOLFI *et al.*, (2014). O exame de eletromiografia constitui um importante método para diagnóstico de doenças neuromusculares. Na miotonia hereditária, o exame apresenta elevada taxa de detecção das descargas miotônicas típicas da canalopatia (DROST *et al.*, 2015).

Em pacientes com miotonia hereditária, alterações histológicas constituem achados inespecíficos. No entanto, são recomendadas para confirmação da ausência de distrofia das fibras musculares. Os resultados deste estudo descartam a presença de alterações distróficas, constatando a miotonia não distrófica (VITE, 2002; GANDOLFI *et al.*, 2014; MONTEAGUDO *et al.*, 2015).

A análise genética permitiu a identificação da inserção de quatro pares de bases no gene *CLCN1*, que codifica o canal CLC-1 do músculo esquelético, bem como a presença de um transcrito alternativo no cDNA do cão miotônico, justificando as alterações da função do canal de cloro na musculatura esquelética e, consequentemente, o distúrbio muscular (ALEJO-GONZÁLEZ *et al.*, 2016).

A miotonia não distrófica observada neste estudo foi a miotonia hereditária causada pela mutação NM_001003124.2: c.436_437insCTCT no gene *CLCN1*. A

disfunção do canal desencadeia redução da condutância de cloreto, responsável por manter a condutância de membrana do músculo esquelético em repouso. Desta forma, o relaxamento muscular é retardado pela resistência de retorno da membrana ao estado de repouso (FRANKE *et al.*, 1991; DUTZLER *et al.*, 2002; DUFFIELD *et al.*, 2003).

A mutação encontrada caracteriza uma “*frameshift*”, decorrente da inserção de um número de nucleotídeos não múltiplos de 3 (CTCT), que reorganiza a sequência de nucleotídeos, originando uma nova sequência de códons e, conseqüentemente, de aminoácidos para a composição protéica. A proteína codificada, resultante do erro no quadro de leitura para tradução, torna-se diferente da proteína formada pela sequência codificadora original (REGATEIRO, 2007).

A mutação NM_001003124.2: c.436_437insCTCT implica na inserção de um aminoácido p.Y145S e alteração da localização de vários aminoácidos subsequentes, resultando em um *stop codon* prematuro p.M194X. O reagrupamento dos nucleotídeos frequentemente origina um “*stop codon*” que desencadeia uma interrupção prematura da constituição da proteína (PELLEY, 2007). As mutações “*frameshift*” deslocam o quadro de leitura do ribossomo e causam a terminação prematura da tradução em um codon de terminação (TAA, TAG, TGA). Após a mutação, aminoácidos incorretos são codificados e os códons de terminação são produzidos (PELLEY, 2012).

A proteína predita do cão miotônico apresenta 193 aminoácidos, dos quais apenas os 145 primeiros são idênticos a sequência de referência da proteína CLC1 para a espécie canina (NP_001003124.1). O stop códon prematuro (M194X) implica na ausência de 80,46% (795/988) dos aminoácidos c-terminais da proteína CLC1, resultando na perda total de regiões conservadas e importantes da proteína CLC1, como as α hélices D até a R, os domínios CBS, e dois dos três aminoácidos conservados que participam da formação do poro seletivo para íon cloreto. A significativa perda na estrutura da proteína suporta a mutação NM_001003124.2: c.436_437insCTCT como sendo a causadora da miotonia (FENG *et al.*, 2010).

Outra alteração observada no cão miotônico foi a presença de um transcrito alternativo caracterizado por NC_006598.3 (NM_001003124.2): c.774_775ins [6442_6520], em que um fragmento intrônico (porção central do íntron 6)

compreendendo 79 nucleotídeos foi inserido na junção dos éxons 6 e 7. O transcrito alternativo é resultado do mecanismo de *splicing* alternativo, processo que permite a um pequeno número de genes propiciar o aumento da diversidade de proteínas codificadas (BLENCOWE, 2006; NAKKA *et al.*, 2018).

A maioria dos genes possuem as regiões codificantes dispostas de maneira descontínua, intercaladas por íntrons. Com o processo de transcrição, os genes passam a ser expressos como RNAs precursores e, posteriormente, os exons são transcritos em RNA contínuo (WARD; COOPER, 2010). O uso diferencial de exons permite o *splicing* alternativo. Os mecanismos que regulam esse processo atuam no direcionamento do spliceossomo, do complexo de *splicing* e das proteínas de ligação auxiliares de RNA ao local correto de remoção dos exons e íntrons. Mutações que alteram o *splicing* podem causar ou contribuir para a suscetibilidade às doenças, como a MH observada nesse estudo (LOPEZ, 1998; CLARK, 2010; WANG *et al.*, 2014; ZHENG, 2016; ZHAI *et al.*, 2016).

Uma das hipóteses para a existência do *splicing* descrito neste estudo, conhecido como *intron retention*, é que mutações em locais aceitadores (extremidade 3' do íntron) e locais doadores (extremidade 5' do íntron) determinam a retenção intrônica, afetando o processamento de RNA (FURUYA, 2018).

A presença de íntrons mais longos em mamíferos justificaria uma menor eficiência da maquinaria de *splicing* em reconhecer os exons. Outra característica que relaciona a susceptibilidade dessa área do gene à ligação do fator de transcrição é o maior conteúdo de CG no íntron. A frequência de *stop códon* também sugere potenciais sequências codificadoras (GALANTE *et al.*, 2004). O *intron retention* é considerado o tipo mais raro de *splicing* alternativo, enquanto o *exon skipping* ocorre com mais frequência (KIM *et al.*, 2007).

A disfunção protéica e o funcionamento do canal de cloreto não foram avaliados neste estudo. No entanto, é possível inferir, diante das alterações clínicas e dos achados eletromiográficos, que há redução do íon Cl⁻ em quantidade suficiente para garantir a persistência da hiperexcitabilidade do músculo esquelético após contração, resultando em miotonia (BARCHI, 1975; CANNON, 2006; PEDERSEN *et al.*, 2016).

A investigação do gene *CLCN1* de dez cães geneticamente relacionados, juntamente com o primeiro cão do estudo, resultou em dois cães afetados, cinco cães foram considerados heterozigotos para a mutação NM_001003124.2: c.436_437insCTCT, incluindo os progenitores dos cães afetados, e quatro fêmeas não foram portadoras ou afetadas pela mutação. Considerando que a enfermidade possui caráter recessivo, acasalando-se dois animais recessivos, a probabilidade de haver animais afetados na prole é de 100%, enquanto o acasalamento de dois animais heterozigotos resulta em 25% de animais afetados na prole. A partir das informações de Pedigree dos cães envolvidos na pesquisa foi possível elaborar um heredograma e correlacionar o grau de parentesco entre eles, bem como identificar um ancestral comum entre os cães geneticamente relacionados com o primeiro cão do estudo. A análise do heredograma aponta o avô materno, que também é bisavô parterno dos cães miotônicos, produtor de animais heterozigotos em diferentes acasalamentos, como provável disseminador da inserção causadora da enfermidade (GRIFFITHS, 2016).

Posteriormente, 33 cães da raça *American Bulldog*, não relacionados geneticamente com os primeiros animais do estudo, foram genotipados com o objetivo de padronizar um teste molecular diagnóstico para a mutação NM_001003124.2: c.436_437insCTCT. Nenhum dos animais foi afetado ou heterozigoto para a mutação descrita, sugerindo que a enfermidade esteja restrita a uma população com um ancestral comum. O teste genético constitui uma possível abordagem quando houver suspeita de miotonia hereditária em cães da raça (RHODES *et al.*, 1999; QUITT *et al.*, 2018).

7. CONCLUSÃO

Este estudo constitui a primeira descrição clínica e molecular de miotonia hereditária em cães da raça *American Bulldog*. O histórico familiar, os sinais clínicos, achados eletromiográficos e moleculares confirmam a suspeita diagnóstica. Animais geneticamente relacionados foram genotipados e indivíduos heterozigotos foram identificados, bem como outro cão afetado pela miotonia. Progenitores não são afetados, sendo heterozigotos para a mutação NM_001003124.2: c.436_437insCTCT no gene *CLCN1*, caracterizando a MH de padrão de herança

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

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

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

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

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

BROWN, G.L.; HARVEY, A.M. Congenital myotonia in the goat. **Brain**, 62, p. 341 – 363, 1939.

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

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

CHEN, A.V.*et al*., Confirmed 2,4-dichlorophenoxyacetic acid toxicosis in a dog. **Journal of the American Animal Hospital Association**, v. 46, n. 1, p. 43–47, 2010.

CLARK, B. J., 2.04 – Control of Gene Expression, *in*: MCQUEEN, Charlene A. (Org). **Comprehensive Toxicology** (Second Edition), Oxford Elsevier, p. 51-69, 2010.

COLDING-JORGENSEN, E. Phenotypic variability in myotonia congenita. **Muscle Nerve**, 32:19–34, 2005.

DEWEY, C.W. **Disorders of the Peripheral Nervous System**. In: 50° Congresso Nazionale Multisala SCIVAC – Rimini, Italia, 2005.

DEWEY, C.W.; TALARICO, L.R. Miopatias: distúrbios dos músculos esqueléticos. In: DEWEY, C.W.; COSTA, R.C. **Neurologia Canina e Felina - Guia Prático**. 1ª ed. São Paulo: Editora Guará Ltda. p.545-589, 2017.

DONNER, J.*et al*., Genetic panel screening of nearly 100 mutations reveals new insights into the breed distribution of risk variants for canine hereditary disorders. **PLoS One**. 11: e0161005, 2016.

DROST, G. *et al*, Myotonic discharges discriminate chloride from sodium muscle channelopathies, **Neuromuscular Disorders**, v. 25, n. 1, p. 73–80, 2015.

DUFFIELD, M. *et al*., Involvement of helices at the dimer interface in CIC-1 common gating. **J. Gen. Physiol.**, 121 pp. 149-161, 2003.

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

DZAKUMA, J.; RISCH, E. The Potential of Tennessee Stiff-Legged Goats. In Meat Production. **ResearchGate**, [s.l.: s.n.], 1996. Disponível em

https://www.researchgate.net/publication/288824893_THE_POTENTIAL_OF_TENNESSEE_STIFF-LEGGED_GOATS_TS_IN_MEAT_PRODUCTION
ENSEMBL:chloride voltage-gated channel 1 [Source:VGNC Symbol;Acc:VGNC:39301]. Location :Chromosome 16: 6,342,772-6,373,580 reverse strand. (CanFam3.1:CM000016.3). Disponível em<https://www.ensembl.org/Canis_familiaris/Gene/Sequence?db=core;g=ENSCAFG000000003619;r=16:6342772-6373580;t=ENSCAFT000000020333>

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

PAPIZAN, J.B.*et al.*, Deficiency in Kelch protein Khlh31 causes congenital myopathy in mice. **Journal of Clinical Investigation**, v.127, n.10, p.3730-3740, 2017.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Trabalho redigido para submissão na revista “Skeletal Muscle Journal”

Normas: <https://skeletalmusclejournal.biomedcentral.com/submission-guidelines/preparing-your-manuscript/research>

Identification of frameshift mutation in the *CLCN1* gene associated with hereditary myotonia in American Bulldog

Adilson Donizeti Damasceno - Universidade Federal de Goiás

Alexandre Secorun Borges - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho

César Erineudo Tavares de Araújo - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho

Daiane de Jesus Rodrigues - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho

Diego José Zanzarini Delfiol - Universidade Federal de Uberlândia

João Pessoa Araújo Júnior - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho

José Paes de Oliveira Filho - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho

Luine Gabriela Hilário Fonseca - Universidade Federal de Uberlândia

Sandra Regina Torelli -

Abstract

Background

Hereditary myotonia is a genetic disorder that occurs due to mutations in the chlorine channel resulting in delayed relaxation of skeletal muscle. The main clinical signs are generalized stiffness and muscle hypertrophy. The disease has already been described in different species. Twelve dog breeds have been identified with the disease. Hereditary myotonia has been described at the molecular level only in Miniature Schnauzer dogs, Australian Cattle Dog, Border Collie, Jack Russell Terrier and Labrador Retriever, it was never described in dogs of the American Bulldog breed.

Hypothesis

Animals with hypertrophy and muscle stiffness present myotonia caused by mutation in the chlorine channel coding gene in dogs of the American Bulldog breed.

Animals

Forty-four American Bulldog were used in the research, constituting three study groups. The first group included a clinically affected dog. The second group consisted of ten dogs genetically related to the dog of the first group. Finally, the third group included 33 unrelated dogs and dogs from other groups.

Methods

A dog was clinically evaluated, submitted to electromyography, histopathology and molecular analysis of the *CLCN1* gene. Ten dogs genetically related to the first were genotyped for the mutation identified. Another 33 unrelated American Bulldog were genotyped through PCR and Sanger sequencing, for standardization of a molecular diagnostic test.

Results

The clinical examination of the dog allocated in the first group resulted in the observation of muscle hypertrophy, myotonia, and warm up phenomenon. During the electromyography exam (EMG) myotonic discharges were present. A frameshift mutation, NM_001003124.2: c.436_437insCTCT, was verified in the *CLCN1* gene. The presence of alternative transcript NC_006598.3 (NM_001003124.2): c.774_775ins [6442_6520] was observed in the myotonic dog gene. Heterozygotes, wildtype dogs and another dog affected by mutation NM_001003124.2: c.436_437insCTCT were observed among the ten genetically related dogs. All dogs of the third group were considered wildtype for the mutation described.

Conclusions and clinical importance

The clinical signs observed, the findings on the electromyographic exam and the changes found in the *CLCN1* gene corroborate with the diagnosis of hereditary myotonia. A genetic test of hereditary myotonia for the mutation NM_001003124.2: c.436_437insCTCT was standardized by the Sanger sequencing method. Molecular testing can be used to guide mating. The study contributes to the understanding of the pathophysiology of HM by broadening the spectrum of mutations in the *CLCN1* gene related to illness and constitutes the first description of HM in American Bulldog.

Key words: Chloride channel, skeletal muscle, electromyography, molecular, muscular hypertrophy, Sanger sequencing.

Introduction

Myotonia is a clinical sign resulting from delayed relaxation of skeletal muscles after voluntary contraction, electrical or mechanical stimulation [17]. Myotonic syndromes are a group of diseases characterized by myotonia associated with other muscle dysfunctions. The classification of myotonia is generally based on heredity and clinical presentation [37].

Myotonies may or may not be associated with muscular dystrophy [67] and may be characterized as congenital [1] or acquired [13,40]. As for non-dystrophic myotonies, they are divided into two large groups: those that imply in chloride channel dysfunction and those with sodium channel dysfunction [43]. Hereditary myotonia is the main disease resulting from dysfunction of the chloride channel CLC1 [15].

Among the hereditary non-dystrophic myotonic diseases, hereditary myotonia (HM) is an important disease that impacts the mobility of people, affecting the quality of life [41]. Clinically, HM is characterized by the appearance of myotonia after the onset of a movement and tends to improve after repeated movements, a phenomenon known as "warm-up". It is observed, in most patients, the development of muscle hypertrophy. HM results from mutations in the *CLCN1* gene, which encodes the selective channel for chloride ion in skeletal muscle tissue (CLC-1) [42]. Mutations that cause inadequate functioning of voltage-dependent ionic channels of skeletal muscle imply in disorders of sarcolemal excitability, myotonia, for example, results from the hyperexcitability of the muscle membrane [11].

In humans, mutations that cause HM have an autosomal dominant inheritance pattern, known as Thomsen's disease and autosomal recessive, known as Becker's disease. Currently, more than two hundred mutations in the *CLCN1* gene have been described, mutations in autosomal recessive inherited myotonia [53, 50] and dominant myotonia [22, 60].

Among the animal species with descriptions of HM are mice [46], goats [6], cats [59, 31, 28, 27], dogs [55, 25, 2, 7, 29, 32, 52, 58], horses [65], buffaloes [9], sheep [44] and pigs [3]. The descriptions of non-dystrophic myotonia in goats greatly contributed to the study and understanding of myotonia [36]. Initially, only variations of the clinical manifestation were used for the diagnosis [10]. Subsequently, with the availability of molecular studies, a

missense mutation was described in the *CLCN1* gene, characterized by the replacement of a proline by alanine [6].

The first reports of dogs affected by hereditary myotonia appeared in the 1980s. According to one of the reports, a 4-month-old Chow Chow female had limb stiffness, pelvic limb ataxia and sudden falls, described as occasional collapse. At the time, the diagnosis consisted basically in the evaluation of the history, clinical manifestations, electrodiagnosis and microscopic examination of biopsied muscle to confirm the absence of muscular dystrophy [2, 23, 58].

Subsequently, descriptions of hereditary myotonia were also made in Staffordshire terrier [56], Great Dane [33], Cocker Spaniel [32], Schnauzer Miniatura [55, 61], Rhodesian Ridgeback, West Highland White terrier, Samoyed cross [16], Australian cattle dog [25], Jack Russell terrier [38], Border Collie [17, 18] and Labrador Retriever [52]. Genetic mutations in the *CLCN1* gene, compatible with hereditary myotonia, were described in dogs of the breeds Schnauzer Miniatura, Australian cattle dog, Border Collie, Jack Russell terrier and Labrador Retriever [55, 25, 17, 18, 38, 52].

For the standardization of a molecular genetic test, capable of detecting mutations of the *CLCN1* gene, related to hereditary myotony in Miniature Schnauzers dogs, 372 dogs of the race were tested between March 2000 and October 2001, in the United States, Canada, Europe and Australia. A DNA test of enzymatic digestion of PCR products, amplified using a single pair of primers for the mutation in the CLC-1 allele, showed that 20.4% of the animals were carriers of the mutation and 1.1% were dogs affected by myotonia. The findings of the genetic test, together with the genealogical analysis, allowed to relate a reproducer as a common ancestor of all carriers and affected dogs [7].

The present study consists of the first description, under clinical, electromyographic and molecular aspects, of the hereditary myotony in American Bulldog dogs. Thus, the objectives of the study were (1) To sequence the gene responsible for coding the chloride channel in the skeletal muscle of a normal dog and an affected dog, (2) To identify and locate the possible mutation responsible for the myotonic disease in the *CLCN1* gene, (3) To construct a heredogram to determine pattern of inheritance and (4) To standardize a molecular diagnostic test for the type of mutation involved.

119 **Material and Methods**

120 This study was approved by the Ethics Committee for the Use of Animals (CEUA) of the
121 Faculty of Veterinary Medicine and Zootechnics of University State of São Paulo (UNESP),
122 Campus Botucatu, Brazil (CEUA 0173/2018).

123 **Animals**

124 The study was conducted in three stages. The first stage comprised the evaluation of an
125 American Bulldog dog, clinically affected by hereditary myotony. The dog was identified as
126 dog number 1 and submitted to physical examination and electromyography examination.
127 Blood collection, muscle biopsy for histopathological examination and molecular study of the
128 *CLCN1* gene were performed.

129 In order to standardize the molecular analysis of the *CLCN1* gene, two other dogs, identified
130 as wildtype, were included in the first stage for negative control. One wildtype dog
131 corresponds to the muscle sample and the other to the blood sample, aiming at comparison
132 with the samples of dog 1.

133 In the second stage of the study, blood samples were collected from ten dogs genetically
134 related to the first dog; the genetic correlation was attested through the information available
135 in the Pedigree Database. The dogs were genotyped for the mutation found in the study of the
136 gene, performed in the previous step. The identification of the samples proceeded with the
137 sequence of numbers: (2-11). The samples number 2 and 3 correspond, respectively, to the
138 father and the mother of the dog number 1. The maternal aunt corresponds to number 4. The
139 numbers 5, 6, 7 and 8 are brothers, being that only the number 7 is sister of same litter. The
140 sample number 9 is of the niece. The numbers 10 and 11 correspond to samples of dogs
141 whose grandfather is a common ancestor.

142 Finally, the third stage of the study understood the collection of blood of 33 dogs not related
143 with the dog number 1, until fifth degree. These samples were identified with the sequence of
144 numbers: (12-44) and genotyped through PCR and Sanger sequencing for standardization of a
145 molecular diagnostic test.

146 **Anamnesis, physical examination and electromyography examination**

147 The American Bulldog dog, male, not castrated, white and brown coat was attended on
148 October 9, 2017, at five months of age. The main complaint consisted of generalized
149 hypertrophy of the skeletal muscles associated with stiff walking and constant falls when

stimulated to walk. A video made when the dog was 2 months old was submitted for evaluation.

The patient's family history showed the existence of a sister of the same litter who presented similar clinical signs. It was not possible to examine her, but the video analysis and images confirmed the presence of hypertrophy of the neck and proximal region of the limbs, in addition, when she was exercised, she presented an episode of muscle stiffness of short duration that improved after exercise.

In dog 1, the general physical examination, examination of the skeletal and neurological muscle system were performed. The same dog was submitted to the examination of electromyography, in two moments: before the procedure of muscular biopsy and after the procedure, during the anesthetic recovery. The equipment used for the electromyographic evaluation was the electroneuromyograph (Neuromap® ENMG/PE, Neurotec®, Itajubá, MG, Brazil). To perform the examination, which aims to evaluate the patient at rest, the dog was kept in quadrupedal position or in lateral decubitus. With the use of needle electrodes, the proximal muscles of the pelvic and thoracic limbs were evaluated and an electromyographic trace was obtained. In the second EMG examination, performed during anesthetic recovery, the same muscles and tongue were evaluated. The tracing of the waveform, frequency, amplitude and sound produced was analyzed.

Muscular biopsy: histopathological examination

The incisional biopsy procedure was performed only in dog 1, aiming at obtaining a muscle sample for histological and molecular examination, in order to confirm the diagnostic suspicion of hereditary myotony. Anesthetic planning consisted of the use of 2 µg/kg fentanyl and 5 mg/kg propofol for anesthetic induction and maintenance with 2.5 V% isoflurane under synchronized intermittent ventilation. The patient was positioned in lateral decubitus position and a trichotomy was performed in the distal lateral region of the humerus and antisepsis with degerming and alcoholic chlorhexidine. On the scapular portion of the deltoid muscle, an approach of approximately 3 cm allowed muscle biopsy, after cutaneous incision and divulsion of the subadjacent tissues a fragment with dimensions close to 2.0 x 1.0 x 0.5 cm (length, depth and width) was removed. After removal of the muscle sample, dermorraphy was performed using 3-0 nylon wire in a Wolff pattern.

The samples were stored in cryotubes containing 10% buffered formalin and cryotubes with RNA stabilization solution (RNAlater tissue collection, Invitrogen™, Waltham, MA, USA),

aiming at histological analysis and genetic testing for the *CLCN1* gene, respectively. The tubes were immersed in liquid nitrogen for further analysis.

For histopathological examination, samples of skeletal muscle were stored in 10% formalin and later submitted to histological section. After a procedure involving the use of paraffin, sections with 6 to 8 μm allowed the production of slides stained with hematoxylin and eosin. The material obtained was subjectively analyzed for morphological changes and the presence of degenerative or necrotic processes.

Extraction of RNA and production of cDNA

The RNeasy® Mini Kit (Qiagen®, USA) was used to extract the total RNA from the muscle samples of dog 1 and wildtype dog, according to the manufacturer's recommendations. Then, the spectrophotometry analysis performed on the Nanodrop™ (Thermo Scientific™, USA) device allowed evaluation of the purity and concentration of the samples, considered acceptable the samples whose ratio between the absorbance values was approximately 1.8. Subsequently, the viable samples were treated with the enzyme RQ1 RNase-FreeDNase (Promega®, USA) to eliminate residual genomic DNA, and again the sample was submitted to purity and concentration measurement, in the spectrophotometer. The next step consisted in the preparation of the complementary DNA strand (cDNA), a final volume of 45 μL , following the manufacturer's recommendations, from 500 ng of RNA, "random primers" and the enzyme Improm-II™ RT (Promega®, USA). At the end of the process, two cDNA samples were obtained, identified and stored at -20 °C, one corresponding to the research of the *CLCN1* gene of the wildtype dog and the other of the myotonic gene.

Blood samples: DNA extraction

A whole blood sample of approximately 3 mL, referring to dog 1, was packed in a tube with EDTA, and refrigerated for subsequent DNA extraction. The blood sample from the wildtype dog was also submitted to DNA extraction.

Blood samples were obtained from ten dogs genetically related to the first dog in the study. The samples were stored in a tube containing EDTA and refrigerated for subsequent DNA extraction and processing of the analyses.

Another 33 dogs were submitted to venous blood sampling for DNA extraction and genetic testing. The procedure consisted of collecting 1 to 2 mL of venous blood, using a 21G needle

after asepsis of the puncture site with cotton and alcohol, and placing the sample in a sterile tube with EDTA anticoagulant. The samples were frozen at -20 °C.

For DNA extraction of whole blood samples, the illustra™ blood genomicPrep MiniSpin Kit was used, following the manufacturer's instructions. The purity (A260/280) and DNA concentration were tested in the NanoDrop® 2000 spectrophotometer (Thermo Scientific™) and soon after the samples, when acceptable, were stored in a freezer for the preservation of the material at -20 °C.

Polymerase Chain Reaction, Electrophoresis and Purification of PCR Products

From the cDNA sample of dog 1 and wildtype dog, a polymerase chain reaction (PCR) was performed, aiming at total coverage of the 23 exons. For all exons of the *CLCN1* gene to be sequenced, eight pairs of primers, Forward and Reverse (TABLE 1) were drawn along the *CLCN1* mRNA coding sequence, using the database available in Ensembl: chloride voltage-gated channel 1NC_006598.3 (NM_001003124.2). Later, due to the difficulty of obtaining a good PCR product corresponding to the exon 6 and exon 7 regions, using the primer pairs F2R2, from the myotonic dog's cDNA sample, another primer pair, identified as I6, was designed for amplification and sequencing of the region.

To perform each PCR, the final volume of 25 µl was obtained, and the reaction composition was: 9.5 µl of nuclease free water; 12.5 µl of the GoTaq Green enzyme mix; 0.5 µl of the Forward primer; 0.5 µl of the Reverse primer; and 2 µl of the sample. The PCR was performed in the thermal cycler Mastercycler® PRO SERIES (Eppendorf). The thermal cycling conditions were: initial denaturation of 95 °C for 2 minutes, 40 denaturation cycles at 95 °C for 30 seconds, annealing at 60 °C for 30 seconds, extension at 72 °C for 50 seconds, followed by extension at 72 °C for 5 minutes.

To confirm that the expected product was adequately amplified in the previous step, the PCR product was submitted to agarose gel electrophoresis. For visualization of the agarose gel products, a UV transilluminator was used for electrophoresis and gel images were obtained.

TABLE 1: Identification, size and coverage of the primers used for sequencing the mRNA of the *CLCN1* gene.

IDENTIFICATION OF PRIMER	PRIMER (5'-3')	SIZE OF THE PRODUCT TO BE AMPLIFIED	SCOPE
F1	AGGCTTAAGGAGCTGTATTGGG	536	Exon 1, 2, 3 and part of exon 4
R1	GTTGGGCTGCATCTGGTAGT		
F2	GGAGCATGGATTATGTCAGTGC	504	Exon 4, 5, 6 and 7
R2	TCCGCACAGCAAAGTATGTA		
F3	TGTGCTGTAGGAGTTGGCTG	476	Exon 8, 9, 10 and 11
R3	TCGAATAGGGTGCTGATGGC		
F4	CGCCTGCTGTATCCTGGAAT	498	Exon 12, 13 and 14
R4	GTGGGCAATCTGACCCGTTA		
F5	AGGCTATGCGTAATTGGGG	510	Exon 15, 16 and part of 17
R5	TGGTGTCCCTTCCCATCGTA		
F6	GAGCGCTCAGAGCTACAGTC	496	Exon 17, exon 18, 19 and 20
R6	GGTCGATGCAGCAGTAGTCA		
F7	GGATTTAGTGGACAACATGTCACC	574	Exon 21, 22 and 23
R7	GAGGACGAGCTGATTCTTTGA		
F8	TCCCTTGCTCTCTGAGGCT	480	Exon 23 and UTR
R8	TGCCGGAACAAGAAGACCAA		
I6 (Forward)	GCCCTTTCGTCCACATCGC	156	Exon 6 and Exon 7 (cDNA)
I6 (Reverse)	CTCCAAGTGCGTCCCAAAA		

From the DNA samples of dog 1, wildtype dog, ten genetically related dogs and 33 unrelated dogs, PCR was performed. The F2R1 primers were used for amplification and sequencing of the region of interest in the gene, comprising regions of the final portion of exon 3 (from 96° pb), intron 3 and initial portion of exon 4 (from 15° pb).

The performance of each PCR, from the DNA samples, occurred in the same way as the PCR performed from the cDNA samples of myotonic dogs and negative control: the final volume of 25 µl was obtained, and the composition of the reaction: 9.5 µl of nuclease free water; 12.5 µl of the GoTaq Green enzyme mix; 0.5 µl of primer Forward; 0.5 µl of primer Reverse; and 2 µl of the sample. The PCR was performed in the thermal cycler Mastercycler® PRO SERIES (Eppendorf). The thermal cycling conditions were: initial denaturation of 95 °C for 2 minutes, 40 denaturation cycles at 95 °C for 30 seconds, annealing at 60 °C for 30 seconds, extension at 72 °C for 50 seconds, followed by extension at 72 °C for 5 minutes.

The purification of the PCR products was performed using the Wizard SV Gel and PCR Clean-UP System (Promega) Kit, following the manufacturer's recommendations. The purification products, with a final volume of 50 µl, were again submitted to confirmation of the presence of the expected genetic material through electrophoresis. The purified genetic

material was then added to their respective forward or reverse primer, in the final volume of 15 µl, 10 µl of which was purified material and 5 µl of which was primer and then sent to perform the Sanger sequencing.

Gene sequencing and data analysis

The automatic DNA sequencer (Sanger), Model ABI 3500 (Applied Biosystems) was used by the Institute of Biotechnology of the University State of São Paulo, Botucatu Campus, to perform the sequencing. The Geneious Prime and Sequencher DNA Sequence Analysis software were used to align and analyze the sequences. The conference of genetic materials was performed by comparison in each base pair. The sequences obtained were analyzed for quality, product size and compared with the sequence *CLCN1 Canis familiaris* NM_001003124.2 for cDNA and the reference sequence NC_006598.3 for DNA. The comparisons of the sequenced products allowed the interpretation of the results.

Results

Physical Examination, Electromyography and Histopathology

At birth, the animals showed no evident clinical alteration. The clinical signs presented by the patient, present since the age of 45 days, were pronounced muscle hypertrophy in the proximal region of the thoracic, pelvic and neck limbs (Figure 1), stiffness when walking and, when stimulated to physical activities, had muscle stiffness leading to falls (startle response) that kept him in decubitus for some seconds. Myotonia improved with the repetition of the movement, a warm up phenomenon. In a video made when the dog was 2 months old, startle response and warm up phenomenon were observed.



FIGURE 1: American Bulldog, one year and eight months old, presenting hereditary myotony. A. The cranial view shows muscular hypertrophy in the thoracic limbs. B - C. Lateral view, presence of pronounced generalized hypertrophy of the neck muscles and proximal region of the thoracic and pelvic limbs. D. View of the posterior region showing muscular hypertrophy of the pelvic limbs.

The electromyography examination of dog 1 indicated electromyographic tracings in increasing-decreasing pattern (myotonic discharges) of waves and sound similar to a "motorcycle engine", "bomber plane", characteristic of myotony. The findings were repeated in the different places of insertion of the needle and in the different times of performance of the exam (Figure 2).

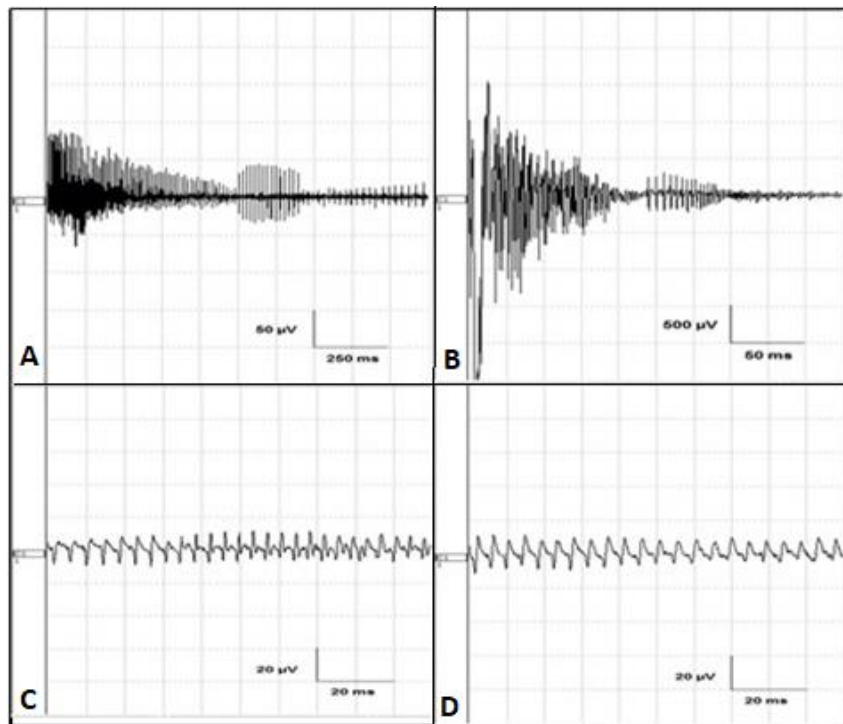


FIGURE 2: Electromyographic tracings in an increasing-decreasing pattern of waves, characteristic of hereditary myotony. The vertical axes represent the intensity (uV) and the horizontal axes correspond to the measurement of time (ms/div). A - B. Myotonic discharges are observed with increasing and decreasing amplitude and frequency, 250 and 50 ms/div correspond, respectively, to the time of analysis. The intensity in A is 50 uV and in B is 500 uV. C - D. Sustained sequence of positive waves and negative peaks, respectively, with analysis time of 20 ms/div.

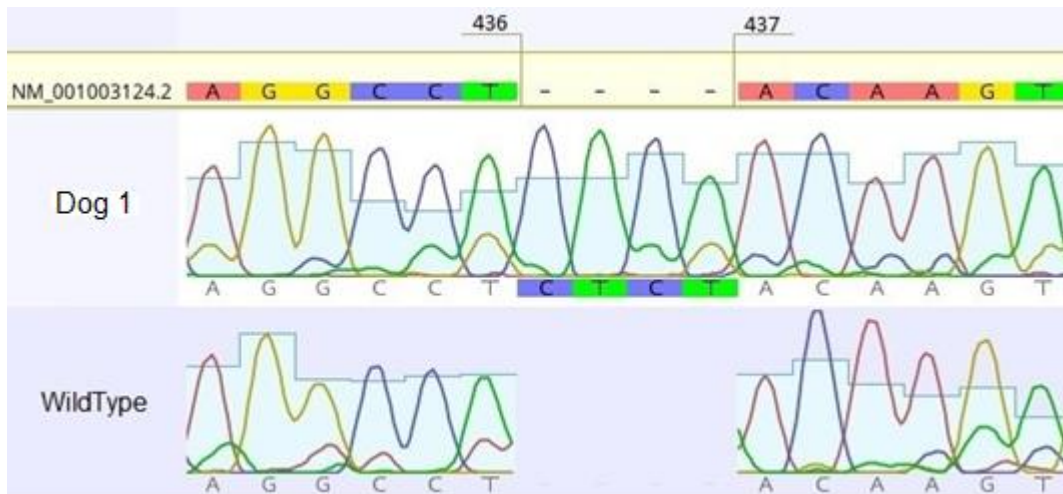
In the histopathological evaluation of the muscular tissue of the myotonic dog, no dystrophic alterations were found, only hypertrophy of some fibers. The absence of additional alterations suggested a pattern of normality of the muscle fibers. The distribution of fibers was homogeneous with a peripheral nucleus and normally distributed connective tissue.

Sequencing the mRNA of the *CLCN1* gene

The comparison of the mRNA sequence of *Canis lupus familiaris* chloride voltage-gated channel 1 (*CLCN1*) obtained from wildtype dog muscle sample with the mRNA sequence NM_001003124.2, deposited in GeneBank™ (NC_006598.3) showed the presence of three synonymous polymorphisms (exons 1, 6 and 23), c.72 C>T, c. 714 T>C and c.2709 T>C, which correspond, respectively, to a tyrosine residue in position 24, Isoleucine in position 238 and Serine in position 903.

In the myotonic dog gene, besides the same polymorphisms found in the wildtype dog, it was observed the insertion of four nucleotides (CTCT) at the beginning of exon 4, soon after the

311 3^apb of exon (NM_001003124.2: c.436_437insCTCT) (Figure 4). This insertion altered the
 312 mRNA reading sequence, causing the formation of a premature codon stop (M194X).



313
 314 **FIGURE 3:** Location of the mutation NM_001003124.2: c.436_437insCTCT in the hereditary myotonia-
 315 affected dog, compared to the reference gene and the negative control dog.

316 The mutation NM_001003124.2: c.436_437insCTCT involves the insertion of an amino acid
 317 p.Y145S and alteration of the location of several subsequent amino acids, resulting in a
 318 premature stop codon p.M194X.

319 The products corresponding to the mRNA samples of dog 1 (myotonic), when amplified from
 320 the primers F2R2 and I6 presented double band, even after repeated PCR reactions. PCR
 321 performed with cDNA samples from the myotonic dog, using the primer pair F2R2, which
 322 flank the exon regions 4, 5, 6 and 7, resulted in the presence of a double agarose gel band
 323 (Figure 5). A product of 500pb and another of approximately 600 pb were observed in the
 324 PCR product of the affected dog. In the wildtype dog, submitted to the same PCR conditions,
 325 only the product of approximately 500 pb size occurs.

326

327

328

329

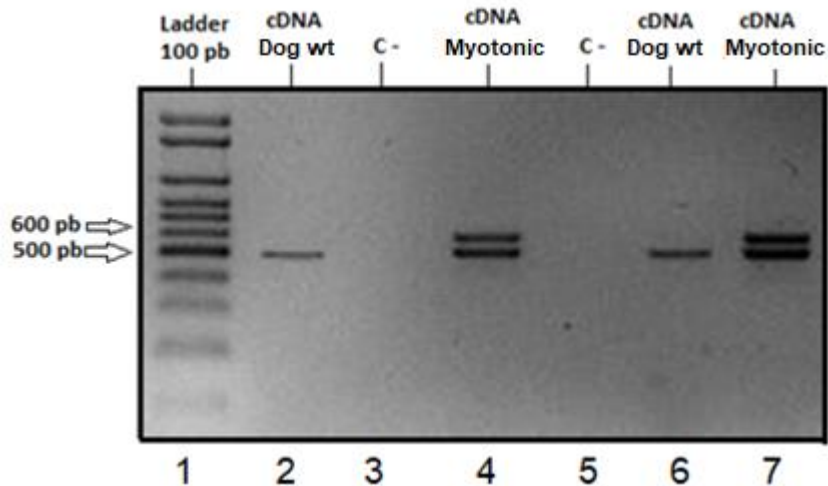


FIGURE 4: Agarose gel with PCR products from cDNA wildtype and Myotonic samples, covering the gene regions corresponding to exons 4, 5, 6 and 7. The double band with products of approximately 500 and 600 pb is observed only in the cDNA of the myotonic dog. Column 1 corresponds to the ladder of 100 bp; column 2, sample cDNA dog wildtype; column 3, negative control; column 4, sample cDNA of the myotonic dog; column 5, negative control for the sample of the affected dog; column 6, sample cDNA dog wildtype; column 7, sample myotonic dog.

Due to the persistence of the double band, the bands were individually cut for sequencing, in order to allow adequate analysis of the region corresponding to the *CLCN1* gene of the myotonic dog. The 500 bp product observed in the gel with the sample of the myotonic dog was similar to that observed in the wildtype dog. The product of approximately 600 bp, observed only in the myotonic dog, differed in the addition of 79 nucleotides "ACCGCGTCTGGGGCAGCTTGATCTCCTGTGTGTCGCCTGCGGGGGGCGGGTGGA TGCTTTGCAGCCTGTCGAG". In the nucleotide sequence of the wildtype animal and in the NC_006598.3 sequence, these 79 nucleotides are found in the central region of intron 6, at position 6442_6520. In the myotonic animal these 79 nucleotides were inserted at the exon 6 and exon 7 junctions (Figure 5) in the transcribed mRNA product. Thus, the presence of an alternative transcript was verified NC_006598.3 (NM_001003124.2): c.774_775ins [6442_6520]. From the cDNA sample of the myotonic animal and the wildtype dog, PCR was performed using the primer pair I6 to flank the exon 6 and exon 7 regions. The resulting product of this new PCR was 156 bp for the wildtype dog. For the myotonic dog, the bands had the sizes of 156 and 235 bp.

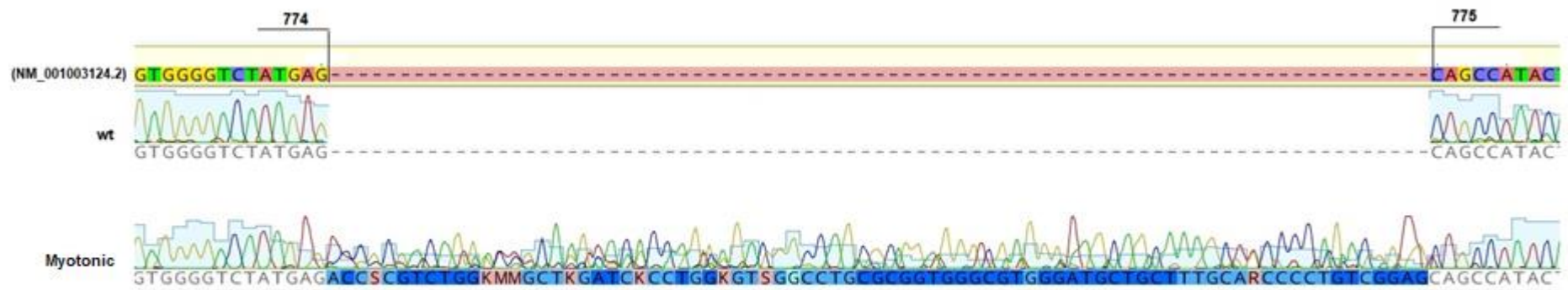


FIGURE 5: Region of exon 6 and exon 7 junctions obtained by aligning the NM_001003124.2 sequences, mRNA wildtype dog and myotonic dog. In the mRNA of the myotonic dog, 79 nucleotides "ACCGCGTCTGGGCAGCTTGATCTCCTGGTGTGTCGCCCCTGCGGGTGGGGATGCTGCTTTGCCCCCTGGAG" were inserted at the exon 6 and exon 7 junction - NC_006598.3 (NM_001003124.2): c.774_775ins [6442_6520].

Genotyping of American Bulldogs related to the affected dog

For sequencing of DNA samples from dogs that have a genetic link with dog 1, the primers chosen were Forward 2 (F2) and reverse 1 (R1), resulting in a product of approximately 600 bp in agarose gel submitted to electrophoresis. The Forward 2 primer (F2) was what resulted in better amplified and sequenced products. The result of the Sanger sequencing enabled analysis of the initial region of exon 4, allowing to attest if the dogs are wildtype, heterozygous or homozygous for the mutation NM_001003124.2: c.436_437insCTCT.

The samples identified with numbers 4, 8, 9 and 10, which correspond, respectively, to the following degrees of kinship with the myotonic dog: aunt, sister of the same father and mother (different litters), niece and presence of a common ancestor (grandfather), did not present the insertion of the "CTCT" bases or double wave peaks in the electropherogram, being considered unaffected dogs and not carriers of the mutation. The parents of the myotonic dog, 2 and 3, as well as the half siblings, 5 and 6, and also 11, whose grandfather is a common ancestor, were heterozygous for the mutation (Figure 6). The double peaks observed in the electropherogram of two heterozygous dogs are illustrated in the Figure 7. Finally, the dog number 7, sister of the same litter, also presented homozygosity for the mutation NM_001003124.2: c.436_437insCTCT.

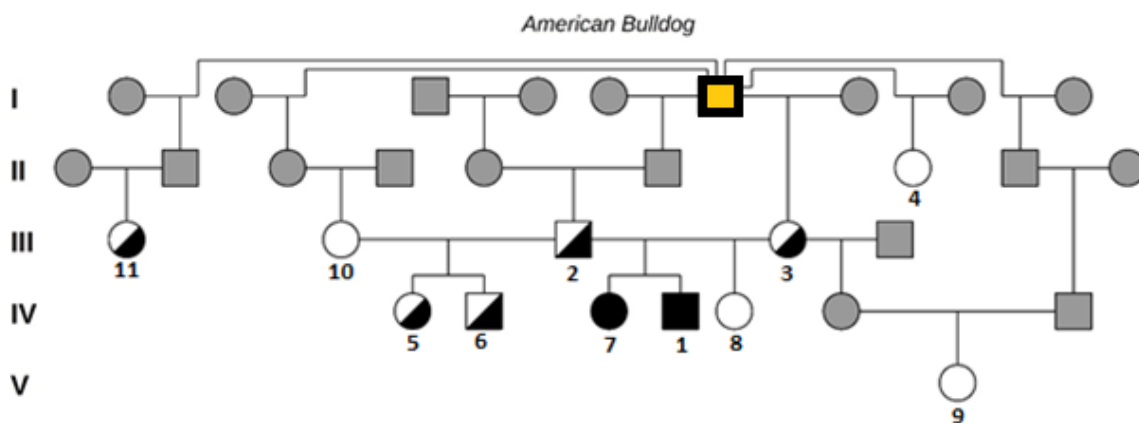


FIGURE 6: Heredogram of the family of American Bulldog affected by hereditary myotony. The non-haired forms correspond to the samples made available for the study. Male dogs were represented by squares and females by circles. The usual forms and filled in gray represent dogs that we did not have access to samples. The completely filled shapes are from the myotonic animals. The squares or partially filled circles are from heterozygous dogs for the mutation NM_001003124.2: c.436_437insCTCT. The shape filled with the yellow color corresponds to the common ancestor of the dogs whose samples were analyzed. The empty shapes correspond to wildtype dogs.

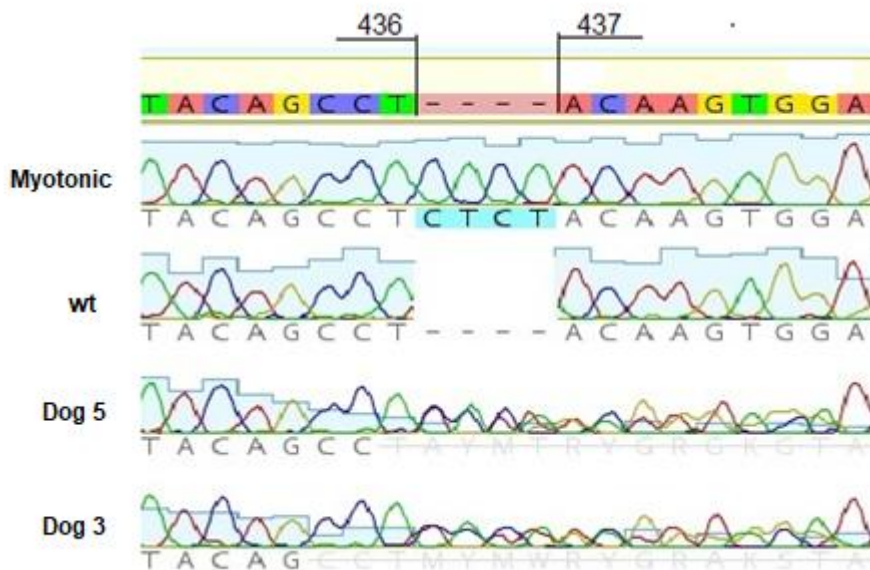


FIGURE 7: Electropherogram of the myotonic, recessive dog for the mutation NM_001003124.2: c.436_437insCTCT, and the wildtype dog compared to two heterozygous dogs for the mutation: Dog 5 (sister) and Dog 3 (mother). Double peaks are observed only in the electropherogram of heterozygous dogs.

Genotyping of samples from dogs of the American Bulldog breed

The genotyping of the 33 dogs not related to dog 1 family revealed that the 33 dogs were wildtype for the mutation NM_001003124.2: c.436_437insCTCT. After analyzing the results of sequencing, it is concluded that none of the dogs carry alleles for the mutation, and there are no affected or heterozygous for the mutation described.

Discussion

An early onset muscle disease was observed in an American Bulldog dog. The clinical signs started at 45 days of age. A sister of the same litter presented similar muscular alterations; the parents were not affected. Thus, the anamnesis and the description of the family history determined the characterization of a hereditary muscle disease with an autosomal recessive inheritance pattern [5].

In dogs, descriptions of hereditary myotonia were made in the Chow Chow [2, 58], Schnauzer Miniatura [55, 61], Cocker Spaniel [32], Australian cattle dog [25], Jack Russell terrier [38], Staffordshire terrier [57], Great Dane [33], Labrador Retriever [52], Border Collie and West Highland White Terrier [17]. However, this is the first description of HM affecting American

Bulldog dogs. The pattern of autosomal recessive inheritance, observed in this study, was described in Schnauzer and Australian cattle dog dogs [61, 25].

Hereditary myotonia, described in the different canine breeds, coincides with the findings of this study. In a dog of the race Cocker Spaniel, male of four months of age, the clinical signs of the disease consisted in the presence of rigidity, spasticity, ataxia of the members and bunny hopping of the pelvic members [32]. The Schnauzer breed comprises the largest number of affected dogs. One study identified the disease in 17 genetically related Schnauzers of which nine were affected [61]. The dogs presented stiff walking, mainly when starting a movement, and improves with exercise. Falls were observed due to rapid changes in posture. Cranial nerves and segmental reflexes were not altered. In the race, the disease manifested dental and craniofacial alterations associated with myotonia and muscle stiffness. The electromyographic examination of the affected dogs revealed myotonic discharges with a duration of approximately 40 seconds [29]. Research involving the Miniature Schnauzer race were the pioneers in relating the clinical signs with chloride channel disorders and analyze the *CLCN1* gene, collaborating with the development of genetic tests for the investigation of dogs with mutations related to hereditary myotonia [55, 61, 7].

In the present study, the dog of the American Bulldog breed presented generalized muscular hypertrophy, prominent in the neck and proximal region of the limbs, and myotonia associated with the "warm-up" phenomenon that corroborated with the diagnosis of hereditary myotonia [1, 42, 56]. The findings described coincide with the symptoms suggestive of hereditary myotonia of recessive character in humans [53, 50] and with the clinical signs suggestive of the disease in several animal species [36, 55, 65, 9, 27, 44, 46], as well as in different breeds of dogs [57, 32, 55, 61, 25, 38, 52].

As verified in the present study, the appearance of clinical signs in the first months of life was observed in the breeds Chow Chow [2], Cocker Spaniel [32], Jack Russell terrier [38] and Labrador Retriever [52].

In the present study, disorders of the skeletal muscle ionic channel associated with changes in the excitability of the sarcolemal membrane, absence of dystrophy, absence of progressive weakness and systemic changes characterize non-dystrophic myotonies. Dysfunctions of the chloride channels suggest hereditary myotonia, dysfunctions of the sodium channels of the skeletal muscle include congenital paramiotony, hyperkalemic periodic paralysis and other myotonies of the sodium channel [40]. The warm up phenomenon, present in the myotonic

dog, together with the other described alterations, occurs in the chloride channel dysfunction. The phenomenon observed results from increased extracellular osmolarity and the support of depolarization of the membrane, due to repetitive contraction of the affected muscle [34].

The results of the EMG examination of dog 1 corroborate the classic pattern of myotonic discharges, evidenced by the "increasing-decreasing" pattern of waves, as well as by the sound similar to a "motorcycle engine" or "bomber plane" [51, 27]. The electromyography examination is an important method to diagnose neuromuscular diseases. In hereditary myotonia, the examination presents a high rate of detection of myotonic discharges typical of channelopathy [21].

In patients with hereditary myotonia, histological alterations are nonspecific findings. However, they are recommended to confirm the absence of muscular fibers dystrophy. The results of this study rule out the presence of dystrophic alterations, confirming the non-dystrophic myotonia [62, 27, 44].

Mutations in the *CLCN1* gene were associated with hereditary myotonia in dogs. In the race Australian Cattle Dog, a dog presenting hypertrophy and generalized muscular rigidity, positive for myotonic discharges typical of the hereditary myotonia, was submitted to the muscular biopsy for realization of genetic analysis. The mutation in the gene *CLCN1*, c.2665insA, resulting in loss of the 88 residues of amino acids C-terminal, was equally observed in dogs of the Australian cattle dog and Border Collie race [25, 18]. In a four-month-old Jack Russell terrier dog, the described alterations consisted of well-defined hypertrophic muscles in the thoracic and pelvic limbs, muscle spasms and generalized rigidity crises with worsening after rest and sudden changes in the direction of movement. The clinical picture improved with exercise. Routine laboratory tests and neurological examination revealed no abnormalities. Missense mutation in *CLCN1*, c.803C> T related to changes in the chloride ion channel contributed to the diagnosis of hereditary myotonia [38]. Missense mutation in *CLCN1*, c.803C> T resulting in p.T268M, was also associated with myotonia in Schnauzers [55, 7].

The most recent study of the disease described myotony in a two-month-old Labrador Retriever. In addition to the typical episodes of movement disorders, resulting from generalized stiffness, with worsening after rest and improvement with prolonged activity, the dog presented oropharyngeal dysphagia and upper airway stridor, induced by excitation. In the electromyography examination, abundant myotonic discharges were observed.

Histological analysis allowed exclusion of structural myopathies. By sequencing the *CLCN1* gene, the c.2275A>T mutation was identified, along with the premature codon p.R759X [52]. Given the different mutations described, it was necessary to investigate the *CLCN1* gene in the dog of this study.

In the American Bulldog (Dog 1), the genetic analysis allowed the identification of the insertion of four pairs of bases in the *CLCN1* gene, that encodes the CLC-1 channel of the skeletal muscle, as well as the presence of an alternative transcript in the cDNA of the myotonic dog, justifying the alterations of the chlorine channel function in the skeletal musculature and, consequently, the muscular disturbance [1]. The non-dystrophic myotonia observed in this study was the hereditary myotonia caused by the mutation NM_001003124.2: c.436_437insCTCT in the *CLCN1* gene. Channel dysfunction triggers a reduction in chloride conductance, responsible for maintaining the membrane conductance of the skeletal muscle at rest. Thus, muscle relaxation is delayed by the resistance of the membrane to return to its resting state [26, 20, 19].

The mutation found features a frameshift. Frameshift mutations result from the insertion of a number of non-multiple nucleotides of three that reorganizes the nucleotide sequence, giving rise to a new sequence of codons and, consequently, amino acids for protein composition. The encoded protein, resulting from the error in the reading frame for translation, becomes different from the protein formed by the original encoding sequence [54]. The NM_001003124.2: c.436_437insCTCT mutation implies the insertion of an amino acid p.Y145S and alteration of the location of several subsequent amino acids, resulting in a premature codon stop p.M194X. The regrouping of nucleotides often results in a "stop codon" that triggers a premature interruption of protein constitution [49]. Frameshift mutations move the ribosome reading frame and cause premature termination of the translation in a termination codon (TAA, TAG, TGA). After mutation, incorrect amino acids are coded and termination codons are produced [48].

The predicted protein of the myotonic dog presents 193 amino acids, of which only the first 145 are identical to the reference sequence of the CLC1 protein for the canine species (NP_001003124.1). The premature stop codon (M194X) implies the absence of 80.46% (795/988) of the c-terminal amino acids of the CLC1 protein, resulting in the total loss of conserved and important regions of the CLC1 protein, such as the α helix D to the R, the CBS domains, and two of the three preserved amino acids that participate in the formation of the

selective pore for chloride ion. The significant loss in protein structure supports the mutation NM_001003124.2: c.436_437insCTCT as the cause of myotony [24].

Another alteration observed in the myotonic dog was the presence of an alternative transcript characterized by NC_006598.3 (NM_001003124.2): c.774_775ins [6442_6520], in which an intronic fragment (central portion of intron 6) comprising 79 nucleotides was inserted at the junction of exons 6 and 7. The alternative transcript is the result of the alternative splicing mechanism, a process that allows a small number of genes to increase the diversity of encoded proteins [8, 45].

Most of the genes have the encoding regions arranged in a discontinuous manner, interspersed by introns. With the transcription process, the genes are expressed as precursor mRNA and, subsequently, the exons are transcribed into continuous mRNA [64]. The differential use of exons allows alternative splicing. The mechanisms that regulate this process act in directing the spliceosome, the splicing complex and the auxiliary binding proteins of RNA to the correct site of removal of exons and introns. Mutations that alter the splicing may cause or contribute to the susceptibility to diseases, such as HM observed in this study [39, 14, 63, 68, 66].

One of the hypotheses for the existence of splicing described in this study, known as intron retention, is the presence of longer introns in mammals, which would justify a lower efficiency of splicing machinery in recognizing exons. Intron retention is considered the rarest type of alternative splicing, while exon skipping occurs more frequently [35].

Protein dysfunction and the functioning of the chloride channel were not evaluated in this study. However, it is possible to infer, in view of clinical alterations and electromyographic findings, that there is a reduction of the Cl⁻ ion in sufficient quantity to ensure the persistence of hyperexcitability of the skeletal muscle after contraction, resulting in myotonia [4, 12, 47].

The investigation of the *CLCN1* gene of ten genetically related dogs, together with the first dog in the study, resulted in two affected dogs, five dogs were considered heterozygous for the mutation NM_001003124.2: c.436_437insCTCT, including the parents of affected dogs, and four females were not carriers or affected by the mutation. From the Pedigree information of the dogs involved in the research it was possible to develop a heredogram and correlate the degree of kinship between them, as well as identify a common ancestor among the dogs genetically related to the first dog in the study. The analysis of the heredogram points out the

maternal grandfather, who is also great grandfather paternal of the myotonic dogs, as probable disseminator of the insertion causing the disease [30].

Subsequently, 33 American Bulldog dogs, not genetically related to the first animals of the study, were genotyped in order to standardize a molecular diagnostic test for the mutation NM_001003124.2: c.436_437insCTCT. None of the animals was affected or heterozygous for the mutation described, suggesting that the disease is restricted to a population with a common ancestor. Genetic testing is a possible approach when hereditary myotonia is suspected in dogs of the breed [55, 52].

Conclusion

This study is the first clinical and molecular description of hereditary myotonia in American Bulldog dogs. Family history, clinical signs, electromyographic and molecular findings confirm the diagnostic suspicion. Genetically related animals were genotyped and heterozygous individuals were identified, as well as another dog affected by myotonia. Progenitors are not affected, being heterozygotes for the mutation NM_001003124.2: c.436_437insCTCT in the *CLCN1* gene, characterizing HM as an autosomal recessive inheritance pattern. Pedigree analysis and genealogical study confirm the presence of a common ancestor among affected and heterozygous individuals.

A molecular test was standardized to diagnose the mutation NM_001003124.2: c.436_437insCTCT, through the Sanger sequencing method, performed from DNA samples. The orientation of matings of American Bulldog dogs can be performed from the molecular test developed in this study.

The results of this study expand the knowledge about the development and causes of hereditary myotonia. The mutation in the *CLCN1* gene should be included in the differential diagnosis panel for myopathies of genetic origin in dogs of this breed.

The development of this research implies the expansion of the list of breeds affected by hereditary myotonia and enables animals of this species to be potential models for human genetic diseases. Finally, this study allows the development of future studies to evaluate the prevalence of the mutation in Brazil and to evaluate if there are phenotypic differences among the animals affected by HM.

References

1. Alejo-González MP, Escobar-Cedillo ME, Hernández-Valadez N, Miranda-Duarte A, Arriaga-Rivera J, Santana Díaz L: **Application of electrophysiological exercise test in patients with congenital myotonia**. Acta Pediatrica Espanola 2016, v. 74, n. 2, p. 50–56.
2. Amann JF, Tomlinson J, Hankison JK: **Myotonia in a chow chow**. Journal of the American Veterinary Medical Association 1985, v. 187, n. 4, p. 415–417.
3. Araújo CET: **Estudo da miotonia hereditária em suínos**. Tese de doutorado. Universidade Estadual Paulista, Campus Botucatu - SP. Departamento de Clínica Veterinária: 2018.
4. Barchi RL: **Myotonia: An Evaluation of the Chloride Hypothesis**. Archives of Neurology 1975, v.32, n.3, p. 175-180.
5. Barohn RJ, Dimachkie MM, Jackson CE: **A Pattern Recognition Approach to the patient with a suspected myopathy**. Neurol Clin. 2014; 32: 569-vii. doi: 10.1016/j.ncl.2014.04.008.
6. Beck CL, Fahlke C, George JR, A.L: **Molecular basis for decreased muscle chloride conductance in the myotonic goat**. Proc. Natl Acad. Sci. 1996, USA, 93, p. 11248-11252.
7. Bhalerao DP, Raipurohit Y, Vite CH, Giger U: **Detection of a genetic mutation for myotonia congenita among Miniature Schnauzers and identification of a common carrier ancestor**. Am J Vet Res 2002, 63: 1443–1447.
8. Blencowe BJ: **Alternative Splicing: New Insights from Global Analyses**. Cell 2006, v. 126, n.1, p. 37-47.
9. Borges AS, Barbosa JD, Resende LA, Mota LS, Amorim RM, Carvalho TL, Garcia JF, Oliveira-Filho JP, Oliveira CM, Souza JE, Winand NJ: **Clinical and molecular study of a new form of hereditary myotonia in Murrah water buffalo**. Neuromuscul Disord 2013, v. 23, n. 3, p. 206-13. ISSN 1873-2364. 0960-8966.
10. Bryant SH, Lipicky RJ, Herzog WH: **Variability of myotonic signs in myotonic goats**. American journal of veterinary research 1968, v. 29, n. 12, p. 2371-2381.
11. Cannon SC: **Channelopathies of skeletal muscle excitability**. Comprehensive Physiology 2015, v. 5, n. 2, p. 761–790.
12. Cannon SC: **Pathomechanisms in channelopathies of skeletal muscle and brain**. Annu Rev Neurosci 2006, v. 29, p. 387– 415.

13. Chen AV, Bagley RS, Talcott PA: **Confirmed 2,4-dichlorophenoxyacetic acid toxicosis in a dog**. Journal of the American Animal Hospital Association 2010, v. 46, n. 1, p. 43–47.
14. Clark BJ: **Control of Gene Expression**, in: MCQUEEN, Charlene A. **Comprehensive Toxicology**, Oxford: Elsevier 2010, p. 51-69.
15. Colding-Jorgensen E: **Phenotypic variability in myotonia congenita**. Muscle Nerve 2005, 32:19–34.
16. Dewey CW: **Disorders of the Peripheral Nervous System**. In: 50° Congresso Nazionale Multisala SCIVAC 2005 - Rimini, Itália.
17. Dewey CW, Talarico LR: **Miopatias: distúrbios dos músculos esqueléticos**. In: Dewey CW, Costa RC. **Neurologia Canina e Felina - Guia Prático**. 1ª ed. São Paulo: Editora Guará Ltda 2017, p.545-589.
18. Donner J, Kaukonen M, Anderson H, Moller F, Kyostila K, Sankari S, Hytonen M, Giger U, Lohi H: **Genetic panel screening of nearly 100 mutations reveals new insights into the breed distribution of risk variants for canine hereditary disorders**. PLoS One 2016, 11: e0161005.
19. Duffield M, Rychkov G, Bretag A, Roberts M: **Involvement of helices at the dimer interface in ClC-1 common gating**. J. Gen. Physiol. 2003, 121 pp. 149-161.
20. Dutzler R, Campbell EB, Cadene M, Chait BT, Mackinnon R: **X-ray structure of a ClC chloride channel at 3.0 Å reveals the molecular basis of anion selectivity**. Nature 2002, v. 415, n. 6869, p. 287-294.
21. Drost G, Stunnenberg BC, Trip J, Borm G, McGill KC, Ginjaar IH, Van der Kooi AW, Zwarts MJ, Van Engelen BG, Faber CG, Stegeman DF, Lateva Z: **Myotonic discharges discriminate chloride from sodium muscle channelopathies**. Neuromuscular Disorders 2015, v. 25, n. 1, p. 73–80.
22. Fahlke C, Beck CL, George Jr AL: **A mutation in autosomal dominant myotonia congenita affects pore properties of the muscle chloride channel**. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 1997, v. 94, n. 6, p. 2729–2734.
23. Farrow BR, Malik, R: **Hereditary myotonia in the Chow Chow**. Journal of Small Animal Practice 1981, 22: 451-465. doi: 10.1111 / j.1748-5827. 1981.tb00629.x
24. Feng L, Campbell EB, Hsiung Y, Mackinnon R: **Structure of a eukaryotic ClC transporter defines an intermediate state in the transport cycle**. Science 2010 (New York, N.Y.), v. 330, n. 6004, p. 635–641.

25. Finnigan DF, Hanna WJ, Poma R, Bendall AJ: **A novel mutation of the *CLCN1* gene associated with myotonia hereditaria in an Australian cattle dog.** J Vet Intern Med 2007, v. 21, n. 3, p. 458-63. ISSN 0891-6640. 0891-6640.
26. Franke C, Laizzo PA, Hatt H, Spittelmeister W, Ricker K, Lehmann-Horn F: **Altered Na⁺ channel activity and reduced Cl⁻ conductance cause hyperexcitability in recessive generalized myotonia (Becker).** Muscle Nerve 1991, 14 pp. 762-770.
27. Gandolfi B, Daniel RJ, O'Brien DP, Guo LT, Youngs MD, Leach SB, Jones BR, Shelton GD, Lyons LA: **A novel mutation in *CLCN1* associated with feline myotonia congenita.** PLOS ONE 2014, San Francisco, USA. Published: October 30.
28. Gaschen F, Jaggy A, Jones B: **Congenital diseases of feline muscle and neuromuscular junction.** Journal of Feline Medicine and Surgery 2004, v. 6, n. 6, p. 355–366.
29. Gracis M, Keith D, Vite CH: **Dental and craniofacial findings in eight miniature schnauzer dogs affected by myotonia congenita: preliminary results.** Journal of veterinary dentistry 2000, v. 17, n. 3, p. 119–127.
30. Griffiths AJF, Wessler SR, Carroll SB, Doebley J: **Introdução à genética.** 11. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2016.
31. Hickford FH, Jones BR, Gething MA, Pack R, Alley MR: **Congenital myotonia in related kittens.** The Journal of small animal practice 1998, v. 39, n. 6, p. 281–285.
32. Hill SL, Shelton GD, Lenahan TM: **Myotonia in a cocker spaniel.** Journal of the American Animal Hospital Association 1995, v. 31, n. 6, p. 506–509.
33. Honhold N, Smith DA: **Myotonia in the great dane.** Vet Rec. 1986; 119: 162.
34. Hoppe K, Chaiklieng S, Lehmann-Horn F, Jurkat-Rott K, Wearing S, Klinger W: **Elevation of extracellular osmolarity improves signs of myotonia congenita in vitro: a preclinical animal study.** Journal of Physiology 2019, v. 597, n. 1, p. 225–235.
35. Kim E, Goren A, Ast G: **Alternative splicing: current perspectives.** BioEssays 2007. 30(1), 38-47.
36. Lipicky RJ, Bryant SH: **Sodium, Potassium, and Chloride Fluxes in Intercostal Muscle from Normal Goats and Goats with Hereditary Myotonia.** Department of Pharmacology, University of Cincinnati, College of Medicine, Cincinnati. The Journal of General Physiology 1966, v. 50.
37. Lipicky RJ: **Myotonic syndromes other than myotonic dystrophy.** In: Handbook of Clinical Neurology, edited by P. J. Vinken and G. W. Bruyn. Amsterdam: Elsevier 1979, vol. 40, p. 533-571. 204.

38. Lobetti RG: **Myotonia congenita in a Jack Russell terrier**. Journal of the South African Veterinary Association 80(2): 106–107 (En.). Bryanston Veterinary Hospital, PO Box 67092, Bryanston, 2021. South Africa, 2009.
39. Lopez AJ: **Alternative Splicing of Pre-mRNA: Developmental Consequences and Mechanisms of Regulation**. Annual Review of Genetics 1998, v. 32, n. 1, p. 279-305.
40. Matthews E, Fialho D, Tan SV, Venance SL, Cannon SC, Sternberg D, Fontaine B, Amato AA, Barohn RJ, Griggs RC, Hanna MG, CINCH Investigators: **The non-dystrophic myotonias: molecular pathogenesis, diagnosis and treatment**, *Brain* 2010, Volume 133, Issue 1, p. 9–22. <<https://doi.org/10.1093/brain/awp294>>
41. Meyer-kleine C, Steinmeyer K, Ricker K, Jentsch TJ, Koch MC: **Spectrum of Mutations in the Major Human Skeletal Muscle Chloride Channel Gene (CLCN1)**. Am. J. Hum. Genet. 1995. 57:1325-1334.
42. Meng YX, Zhao Z, Shen HR, Bing Q, Hu J: **Identification of novel mutations of the CLCN1 gene for myotonia congenital in China**. Neurological Research 2016, v. 38, n. 1, p. 40–44.
43. Montagnese F, Schoser B: **Dystrophic and non-dystrophic myotonias**. Fortschritte der Neurologie Psychiatrie 2018, v. 86, n. 9, p. 575-583.
44. Monteagudo LV, Tejedor MT, Ramos JJ, Lacasta D, Ferrer LM: **Ovine congenital myotonia associated with a mutation in the muscle chloride channel gene**. Veterinary Journal 2015, v. 204, n. 1, p. 128–129.
45. Nakka K, Ghigna C, Gabellini D, Dilworth FJ: **Diversification of the muscle proteome through alternative splicing**. Skeletal Muscle 2018, v. 8, n. 1, p. 8.
46. Papizan JB, Garry GA, Brezprozvannava S, McAnally JR, Bassel-Duby R, Liu N, Olson EN: **Deficiency in Kelch protein Khlh31 causes congenital myopathy in mice**. Journal of Clinical Investigation 2017, v.127, n.10, p.3730-3740.
47. Pedersen TH, Riisager A, de Paoli FV, Chen TY, Nielsen OB: **Role of physiological ClC-1 Cl⁻ ion channel regulation for the excitability and function of working skeletal muscle**. The Journal of general physiology 2016, v. 147, n. 4, p. 291–308.
48. Pelley JW: **Protein Synthesis and Degradation**, in: Elsevier's Integrated Review Biochemistry (Second Edition), p. 149-160. Philadelphia, 2012.
49. Pelley JW: **17 - Protein Synthesis and Degradation**, in: PELLELY, John W. Elsevier's Integrated Biochemistry, Philadelphia: Mosby, p. 147-158. 2007.
50. Portaro S, Altamura C, Licata N, Camerino GM, Imbrici P, Musumeci O, Rodolico C, Camerino DC, Toscano A, Desaphy J: **Clinical, Molecular, and Functional**

Characterization of *CLCN1* Mutations in Three Families with Recessive Myotonia Congenita. *NeuroMolecular Medicine* 2015, v. 17, n. 3, p. 285–296.

51. Preston DC, Shapiro BE: **Electromyography and neuromuscular disorders.** Elsevier:3th, p. 222-228, 2013.

52. Quitt PR, Hytonen MK, Matiassek K, Rosati M, Fischer A, Lohi H: **Myotonia congenita in a Labrador Retriever with truncated *CLCN1*.** *Neuromuscular Disorders* 2018, v. 28, n. 7, p. 597–605.

53. Raja Rayan DL, Haworth A, Sud R, Matthews E, Fialho D, Burge J, Portaro S, Schorge S, Tuin K, Lunt P, McEntagart M, Toscano A, Davis MB, Hanna MG: **A new explanation for recessive myotonia congenita: Exon deletions and duplications in *CLCN1*.** *Neurology* 2012., v. 78, n. 24, p. 1953–1958.

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

55. Rhodes TH, Vite CH, Giger U, Patterson DF, Fahlke C, George AL Jr: **A missense mutation in canine *CLC-1* causes recessive myotonia congenita in the dog.** *FEBS Lett.* 1999 Jul 30;456(1):54-8.

56. Sener U, Martinez-Thompson J, Dimberg E, Laughlin R, Rubin D: **Correlation of electromyography findings to muscle biopsy findings in patients with suspected myopathy** 2018. *Neurology*, v. 90, n. 15.

57. Shires PK, Nafa LA, Hulse DA: **Myotonia in a Staffordshire terrier.** *J Am Vet Med Assoc.* 1983, 183: 229–232.

58. Shores A, Redding RW, Braund KG, Simpson ST: **Myotonia congenita in a Chow Chow pup.** *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 1986. v. 188, n. 5, p. 532–533.

59. Toll J, Cooper B, Altschul M: **Congenital myotonia in 2 domestic cats.** *Journal of veterinary internal medicine / American College of Veterinary Internal Medicine* 1998, v. 12, n. 2, p. 116–119.

60. Tsujino A, Kaibara M, Hayashi H, Eguchi H, Nakayama S, Sato K, Fukuda T, Tateishi Y, Shirabe S, Taniyama K, Kawakami A: **A *CLCN1* mutation in dominant myotonia congenita impairs the increment of chloride conductance during repetitive depolarization.** *Neuroscience Letters* 2011, v. 494, n. 2, p. 155–160.

61. Vite CH, Melniczek J, Patterson D, Giger U: **Congenital myotonic myopathy in the miniature schnauzer: An autosomal recessive trait.** *Journal of Heredity* 1999, v. 90, n. 5, p. 578–580.

62. Vite CH: **Myotonia and disorders of altered muscle cell membrane excitability.** Vet Clin North Am Small Anim Pract. Jan;32(1):169-87, vii, 2002. <[https://doi.org/10.1016/S0195-5616\(03\)00084-6](https://doi.org/10.1016/S0195-5616(03)00084-6)>
63. Wang Y, Liu J, Huang B, Xu Y, Li J, Huang L, Lin J, Zhang J, Min Q, Yang W, Wang X: **Mechanism of alternative splicing and its regulation.** Biomedical reports, 3(2), 152–158, 2014. doi:10.3892/br.2014.407
64. Ward AJ, Cooper TA: **The pathobiology of splicing.** J. Pathol., 220: 152-163, 2010. doi:10.1002/path.2649.
65. Wijnberg ID, Owczarek-Lipska M, Sacchetto R, Mascarello F, Pascoli F, Grunberg W, Van der Kolk JH, Drogemuller C: **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 2012, v. 22, n. 4, p. 361–367.
66. Zhai J, Lin Q-S, Hu Z, Wong R, Soong TW: **Chapter 11 - Alternative Splicing and RNA Editing of Voltage-Gated Ion Channels: Implications in Health and Disease, in: PITT, Geoffrey S. Ion Channels in Health and Disease,** Boston: Academic Press 2016, p. 11.
67. Zhang J, George AL Jr, Griggs RC, Fouad GT, Roberts J, Kwiecinski H, Connolly AM, Ptacek LJ: **Mutations in the human skeletal muscle chloride channel gene (CLCN1) associated with dominant and recessive myotonia congenita.** Neurology 1996, v. 47, n. 4, p. 993–998.
68. Zheng S: **High-Throughput Identification of Novel Alternative Splicing Regulators,** Chapter Twelve - IRAS. In: FILONOV, Grigory S; JAFFREY, Samie R. Methods in Enzymology, Academic Press 2016, v. 572, p. 269-289.

ANEXOS

ANEXO A - Autorização pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da FMVZ-UNESP (protocolo nº 0173/2018).



ATESTADO

Atesto que o Projeto **“CARACTERIZAÇÃO CLÍNICA, ELETROMIOGRÁFICA E MOLECULAR DE MIOTONIA CONGÊNITA EM CÃO DA RAÇA BULLDOG AMERICANO”** **Protocolo CEUA 0173/2018**, a ser conduzido por Daiane de Jesus Rodrigues, responsável/orientador Alexandre Secorun Borges, para fins de pesquisa científica/ensino - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 08 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal - CONCEA.

Finalidade	PESQUISA CIENTÍFICA
Vigência do projeto	31/08/2018 a 31/01/2019
Nome Comum / Espécie / Linhagem	CANINA / CANIS LUPUS FAMILIARIS /
Raça	Bulldog Americano
Nº de animais machos	35
Nº de animais fêmeas	35
Nº de animais sexo indefinido	0
Peso médio de animais machos	10
Peso médio de animais fêmeas	10
Peso médio de animais sexo indefinido	0
Idade	1 ano(s) e 0 mes(es) e 0 dia(s).
Procedência	Canis ou demais voluntários, de todo o Brasil

Projeto de Pesquisa aprovado em reunião da CEUA em 15/08/2018

JOSÉ NICOLAU PRÓSPERO PUOLI FILHO
Presidente da CEUA da FMVZ, UNESP - Campus de Botucatu

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
Seção Técnica Acadêmica
Rua Prof. Dr. Walter Maurício Corrêa, s/n
UNESP - Campus de Botucatu/SP - Cep 18618-681
(14) 3880-2176 - patrizia@fmvz.unesp.br - www.fmvz.unesp.br

ANEXO B - SEQUENCIAS DE CÓDONS PARA *CHLORIDE CHANNEL PROTEIN 1*

Alinhamento NP_001003124[*Canis lupus familiaris*], Cão Miotônico e *wildtype*.

	1	10	20	30	40
CLCN1 Frame 1	A T G C A G C C A T C C C A G T C C C T G C G G C G T G G G G G C G A G C A G A G C T G G T G G				
Miot. to CLCN...	M Q P S Q S L R R G G E Q S W W				
WT to CLCN1 c...	M Q P S Q S L R R G G E Q S W W				
	50	60	70	80	90
CLCN1 Frame 1	G G T A G T G C T C C C C A G T A C C A G T A C A T G C C T T T T G A A C A C T G C A C C A G C				
Miot. to CLCN...	G S A P Q Y Q Y M P F E H C T S				
WT to CLCN1 c...	G S A P Q Y Q Y M P F E H C T S				
	100	110	120	130	140
CLCN1 Frame 1	T A C G G A C T G C C C T C C G A G A A T G G A G C C C T T C A A C A C A G G C T C C A C A G G				
Miot. to CLCN...	T Y G L P S E N G A L Q H R L H R				
WT to CLCN1 c...	T Y G L P S E N G A L Q H R L H R				
	150	160	170	180	190
CLCN1 Frame 1	G A T G C A G G C C T C C G C G C C A A C A C C C G C C C C A C A C A G A T C T A T G G C C A T				
Miot. to CLCN...	D A G L R A N T R P T Q I Y G H				
WT to CLCN1 c...	D A G L R A N T R P T Q I Y G H				

		200		210		220		230		240
CLCN1		200		210		220		230		240
Frame 1		T A C A A A C A G C A A T T C T C A G A C A A G G G A G C A G G A C A C A G G G A T G T C C A A G								
		Y K Q Q F S D K E Q D T G M S K								
Miot. to CLCN...		T A C A A A C A G C A A T T C T C A G A C A A G G A G C A G G A C A C A G G G A T G T C C A A G								
Frame 1		Y K Q Q F S D K E Q D T G M S K								
WT to CLCN1 c...		T A C A A A C A G C A A T T C T C A G A C A A G G A G C A G G A C A C A G G G A T G T C C A A G								
Frame 1		Y K Q Q F S D K E Q D T G M S K								
		250		260		270		280		
CLCN1		250		260		270		280		
Frame 1		A A G A T G G G C T C C A G T G A A A G C A T G G A C A G C A A G G A T G A G G A T C A C T A T								
		K M G S S E S M D S K D E D H Y								
Miot. to CLCN...		A A G A T G G G C T C C A G T G A A A G C A T G G A C A G C A A G G A T G A G G A T C A C T A T								
Frame 1		K M G S S E S M D S K D E D H Y								
WT to CLCN1 c...		A A G A T G G G C T C C A G T G A A A G C A T G G A C A G C A A G G A T G A G G A T C A C T A T								
Frame 1		K M G S S E S M D S K D E D H Y								
		290		300		310		320		330
CLCN1		290		300		310		320		330
Frame 1		T C T A A A T G T C A A G G C T G T G T C C G C C G C C T G G G A C A C G T G G T G A G A A G A								
		S K C Q G C V R R L G H V V R R								
Miot. to CLCN...		T C T A A A T G T C A A G G C T G T G T C C G C C G C C T G G G A C A C G T G G T G A G A A G A								
Frame 1		S K C Q G C V R R L G H V V R R								
WT to CLCN1 c...		T C T A A A T G T C A A G G C T G T G T C C G C C G C C T G G G A C A C G T G G T G A G A A G A								
Frame 1		S K C Q G C V R R L G H V V R R								
		340		350		360		370		380
CLCN1		340		350		360		370		380
Frame 1		A A G T T A G G A G A A G A C T G G A T C T T T C T G G T G C T C C T G G G A C T G C T T A T G								
		K L G E D W I F L V L L G L L M								
Miot. to CLCN...		A A G T T A G G A G A A G A C T G G A T C T T T C T G G T G C T C C T G G G A C T G C T T A T G								
Frame 1		K L G E D W I F L V L L G L L M								
WT to CLCN1 c...		A A G T T A G G A G A A G A C T G G A T C T T T C T G G T G C T C C T G G G A C T G C T T A T G								
Frame 1		K L G E D W I F L V L L G L L M								

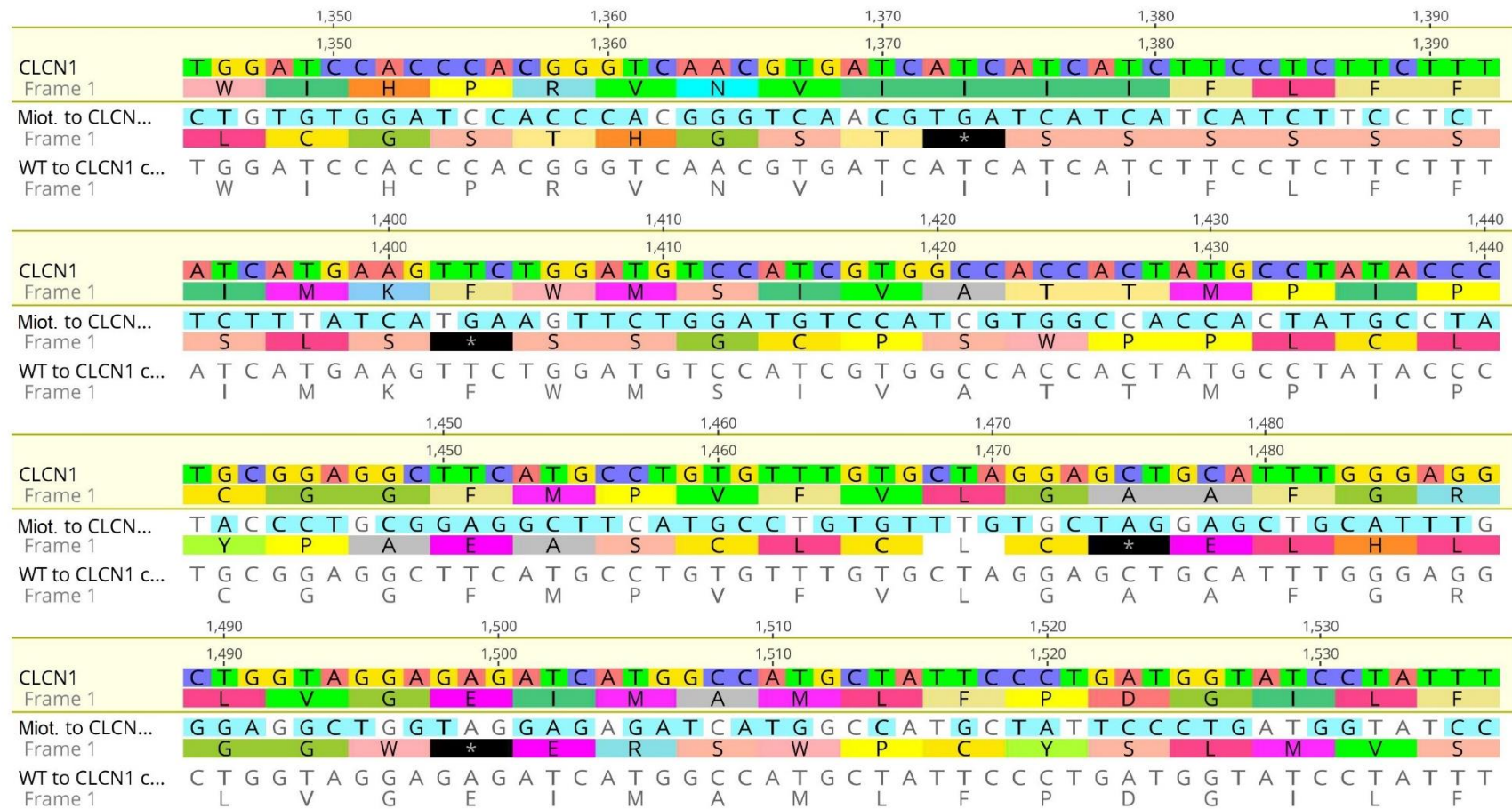
	390	400	410	420	430
CLCN1	G C C C T G G T T A G C T G G A G C A T G G A T T A T G T C A G T G C C A A A A G C C T T C A G				
Frame 1	A L V S W S M D Y V S A K S L Q				
Miot. to CLCN...	G C C C T G G T T A G C T G G A G C A T G G A T T A T G T C A G T G C C A A A A G C C T T C A G				
Frame 1	A L V S W S M D Y V S A K S L Q				
WT to CLCN1 c...	G C C C T G G T T A G C T G G A G C A T G G A T T A T G T C A G T G C C A A A A G C C T T C A G				
Frame 1	A L V S W S M D Y V S A K S L Q				
	440	450	460	470	480
CLCN1	G C C T A C A A G T G G A G C T A C T A C C A G A T G C A G C C C A A C C T G C C T C T G C A G				
Frame 1	A Y K W S Y Y Q M Q P N L P L Q				
Miot. to CLCN...	G C C T C T C T A C A A G T G G A G C T A C T A C C A C A T G C A G C C C A A C C T G C C T C T G C A G				
Frame 1	A S L Q V E L L P H A A Q P A S				
WT to CLCN1 c...	G C C T A C A A G T G G A G C T A C T A C C A G A T G C A G C C C A A C C T G C C T C T G C A G				
Frame 1	A Y K W S Y Y Q M Q P N L P L Q				
	490	500	510	520	
CLCN1	T A C C T G G T C T G G G T C A C C T T C C C G C T A A C T C T C A T C C T C T T C A G C G C C				
Frame 1	Y L V W V T F P L T L I L F S A				
Miot. to CLCN...	G C A G T A C C T G G T C T G G G T C A C C C G C T A A C T C T C A C T C A T C C T C T T C A G				
Frame 1	A V P G L G H P L T L T H P L Q				
WT to CLCN1 c...	T A C C T G G T C T G G G T C A C C T T C C C G C T A A C T C T C A T C C T C T T C A G C G C C				
Frame 1	Y L V W V T F P L T L I L F S A				
	530	540	550	560	570
CLCN1	G T C T T T T G C C A C C T C A T C T C T C C C C A G G C T G T T G G C T C T G G G A T C C C T				
Frame 1	V F C H L I S P Q A V G S G I P				
Miot. to CLCN...	C G C C G T C T T T T G C C A A T C T C T C T C C C C A G G C T G T T G G C T C T G G G A T				
Frame 1	R R L L P I S L S P G C W L W D				
WT to CLCN1 c...	G T C T T T T G C C A C C T C A T C T C T C C C C A G G C T G T T G G C T C T G G G A T C C C T				
Frame 1	V F C H L I S P Q A V G S G I P				

	580	590	600	610	620
CLCN1 Frame 1	G A A A T G A A G A C A A T A C T C C G T G G A G T C A T C C T G A A G G A A T A T C T C A C C				
Miot. to CLCN...	C C C T G A A A T G A A G A C A A T A C T C C G T G G A G T C A T C C T G A A G G A A T A T C T				
WT to CLCN1 c...	G A A A T G A A G A C A A T A C T C C G T G G A G T C A T C C T G A A G G A A T A T C T C A C C				
	E M K T I L R G V I L K E Y L T				
	P * N E D N T P W S H P E G I S				
	E M K T I L R G V I L K E Y L T				
	630	640	650	660	670
CLCN1 Frame 1	C T C A A G G C C T T T G T G G C C A A G G T T G T G G C C C T G A C T G C G G G G C T G G G C				
Miot. to CLCN...	C T C C C T C A A G G C C T T T G T G G C C A A G G T T G T G G C C C T G A C T G G G G G G T				
WT to CLCN1 c...	C T C A A G G C C T T T G T G G C C A A G G T T G T G G C C C T G A C T G C G G G G C T G G G C				
	L K A F V A K V V A L T A G L G				
	L P Q G L C G Q G C G P D W G G				
	L K A F V A K V V A L T A G L G				
	680	690	700	710	720
CLCN1 Frame 1	A G T G G C A T T C C T G T G G G A A G G A G G C C C T T T C G T C C A C A T T G C C A G C				
Miot. to CLCN...	G G G C A G A G G C A T T T G G G T G G G A A G G A G G G T C C T T T C A C C C A C A T C G C				
WT to CLCN1 c...	A G T G G C A T T C C T G T G G G A A G G A G G G C C C T T T C G T C C A C A T C G C C A G C				
	S G I P V G K E G P F V H I A S				
	G Q R H L G G E G S F H P H R				
	S G I P V G K E G P F V H I A S				
	730	740	750	760	
CLCN1 Frame 1	A T C T G T G C T G C G G T C C T C A G C A A G T T T A T G T C C A T G T T C T G T G G G G T C				
Miot. to CLCN...	C A G C A T C T G T G C T G C G G T C C T C A G C A A G T T T A T G T C C A T G T T C T G T G G				
WT to CLCN1 c...	A T C T G T G C T G C G G T C C T C A G C A A G T T T A T G T C C A T G T T C T G T G G G G T C				
	I C A A V L S K F M S M F C G V				
	Q H L C C G P Q Q V Y V H V L W				
	I C A A V L S K F M S M F C G V				

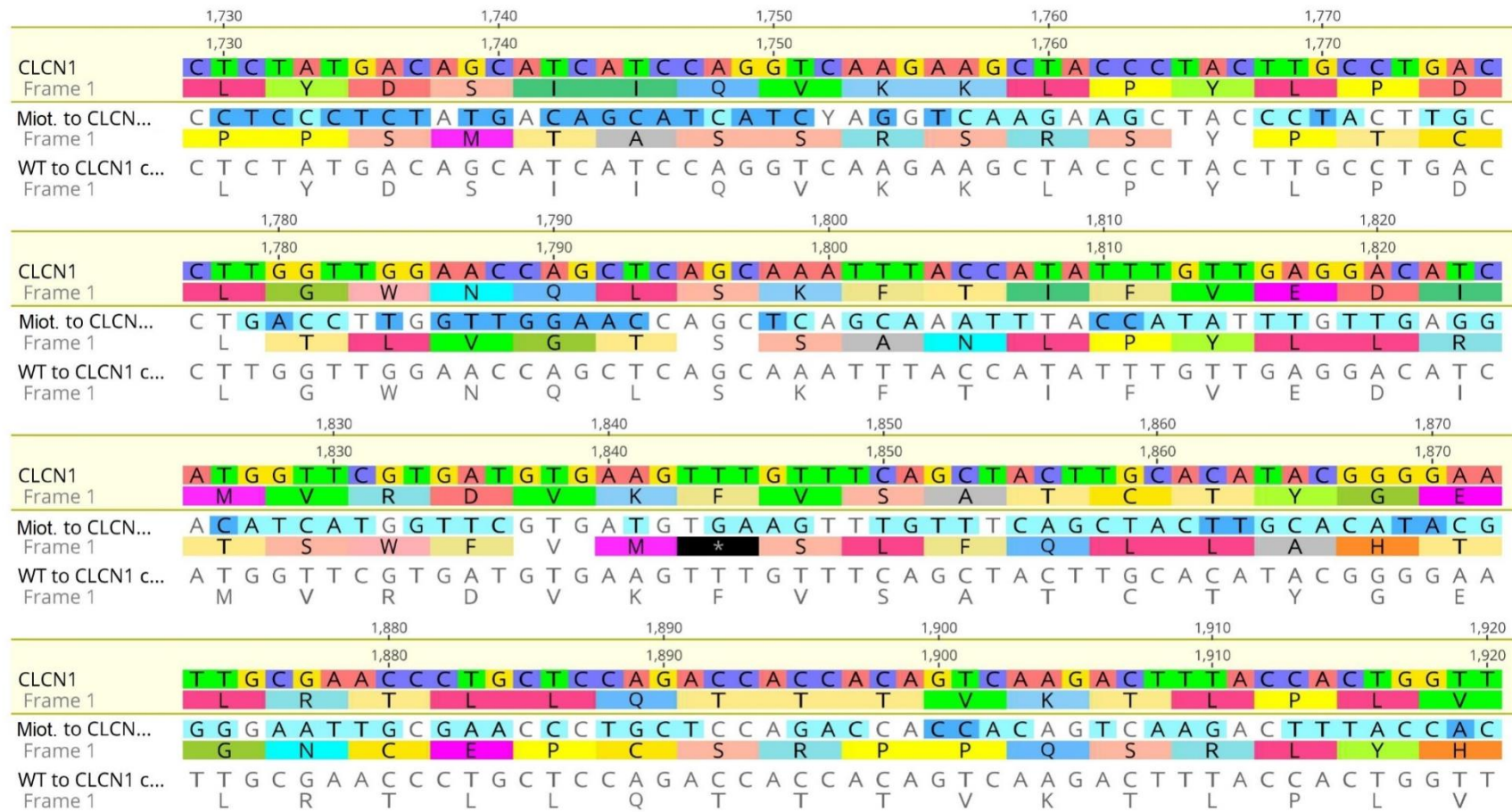
	770	780	790	800	810
CLCN1 Frame 1	T A T G A G C A G C C A T A C T A T T A C A C T G A C A T G C T G A C G G T G G G C T G T G C T				
Miot. to CLCN...	G G T C T A T G A G A C C G C G T T T T G G G C A G C C A G A C A T G C T G A C G G T G G C C T				
WT to CLCN1 c...	T A T G A G C A G C C A T A C T A T T A C A C T G A C A T G C T G A C G G T G G G C T G T G C T				
Frame 1	Y E Q P Y Y Y T D M L T V G C A				
	820	830	840	850	860
CLCN1 Frame 1	G T A G G A G T T G G C T G T T T T G G A C G C C A C T T G G A G G A G T G T T G T T C				
Miot. to CLCN...	G T G C T G T A G G A G T T G G C T G T T T T G G A C G C C A C T T G G A G G A G T G T				
WT to CLCN1 c...	G T A G G A G T T G G C T G T T G T T T T G G A C G C C A C T T G G A G G A G T G T T G T T C				
Frame 1	V L * E L A V V L G R H L E E C				
	870	880	890	900	910
CLCN1 Frame 1	A G C A T C G A G G T C A C C T C T A C A T A C T T T T G C T G T G C G G A A C T A C T G G C G A				
Miot. to CLCN...	T G T T C A G C A T C G A G G T C A C C T C T A C A T A C T T T T G C T G T G C G G A A C T A C T				
WT to CLCN1 c...	A G C A T C G A G G T C A C C T C T A C A T A C T T T T G C T G T G C G G A A C T A C T G G C G A				
Frame 1	S I E V T S T Y F A V R N Y W R				
	920	930	940	950	960
CLCN1 Frame 1	G G A T T C T T T G C A G C C A C G T T C A G T G C C T T T G T T T T C C G C G T G C T G G C C				
Miot. to CLCN...	G G C G A G G A T T C T T T T G C A G C C A C G T T C A G T G C C T T T G T T T T C C G C G T G C				
WT to CLCN1 c...	G G A T T C T T T G C A G C C A C G T T C A G T G C C T T T G T T T T C C G C G T G C T G G C C				
Frame 1	G F F A A T F S A F V F R V L A				

	970	980	990	1,000
CLCN1 Frame 1	G T G T G G A A C A A G G A C G C T G T C A C C A T C A C T G C T C T C T T C A G A A C C A A T			
Miot. to CLCN...	T G G C C G T G T G G A A C A A G G A C G C T G T C A C C A T C A C T G C T C T C T T C A G A A			
WT to CLCN1 c...	G T G T G G A A C A A G G A C G C T G T C A C C A T C A C T G C T C T C T T C A G A A C C A A T			
	1,010	1,020	1,030	1,040
CLCN1 Frame 1	T T C C G A A T G G A T T T T C C C C T T T G A C C T G C A G G A A C T C C C A G C C T T C G C C			
Miot. to CLCN...	C C A A T T T C C G A A T G G A T T T C C C C T T T G A C C T G C A G G A A C T C C C A G C C T			
WT to CLCN1 c...	T T C C G A A T G G A T T T C C C C T T T G A C C T G C A G G A A C T C C C A G C C T T C G C C			
	1,060	1,070	1,080	1,090
CLCN1 Frame 1	A T C A T C G G G A T T T G C T G T G G C T T C C T G G G A G C C G T G T T T G T G T A C C T G			
Miot. to CLCN...	T C G C C A T C A T C G G G A T T T G C T G T G G C T T C C T G G G A G C C G T G T T T G T G T			
WT to CLCN1 c...	A T C A T C G G G A T T T G C T G T G G C T T C C T G G G A G C C G T G T T T G T G T A C C T G			
	1,110	1,120	1,130	1,140
CLCN1 Frame 1	C A T C G C C A A G T C A T G C T C G G T G T C C G A A A G C A C A A G G C C C T C A G C C A A			
Miot. to CLCN...	A C C T G C A T C G C C A A G T C A T G C T C G G T G T C C G A A A G C A C A A G G C C C T C A			
WT to CLCN1 c...	C A T C G C C A A G T C A T G C T C G G T G T C C G A A A G C A C A A G G C C C T C A G C C A A			

	1,160	1,170	1,180	1,190	1,200
CLCN1	1,160	1,170	1,180	1,190	1,200
Frame 1	T T T C T G G C G A A G C A C C G C C T G C T G T A T C C T G G A A T A G T T A C C T T C A T C	F L A K H R L L Y P G I V T F I			
Miot. to CLCN...	G C C A A T T T C T G G C G A A G C A C C G C C T G C T G T A T C C T G G A A T A G T T A C C T	A N F W R S T A C C I L E * L P			
WT to CLCN1 c...	T T T C T G G C G A A G C A C C G C C T G C T G T A T C C T G G A A T A G T T A C C T T C A T C	F L A K H R L L Y P G I V T F I			
	1,210	1,220	1,230	1,240	
CLCN1	1,210	1,220	1,230	1,240	
Frame 1	A T T G C C T C A T T C A C C T T T C C G C C A G G A A T A G G C C A A T T C A T G G C T G G A	I A S F T F P P G I G Q F M A G			
Miot. to CLCN...	T C A T C A T T G C C T C A T T C A C C T T T C C G C C A G G A A T A G G C C A A T T C A T G G	S S L P H S P F R Q E * A N S W			
WT to CLCN1 c...	A T T G C C T C A T T C A C C T T T C C G C C A G G A A T A G G C C A A T T C A T G G C T G G A	I A S F T F P P G I G Q F M A G			
	1,250	1,260	1,270	1,280	1,290
CLCN1	1,250	1,260	1,270	1,280	1,290
Frame 1	G A G T T G A T G C C T C G T G A A G C C A T C A G C A C C C T A T T C G A C A A T A A C A C A	E L M P R E A I S T L F D N N T			
Miot. to CLCN...	C T G G A G A G T T G A T G C C T C G T G A A G C C A T C A G C A C C C T A T T C G A C A A T A	L E S * C L V K P S A P Y S T I			
WT to CLCN1 c...	G A G T T G A T G C C T C G T G A A G C C A T C A G C A C C C T A T T C G A C A A T A A C A C A	E L M P R E A I S T L F D N N T			
	1,300	1,310	1,320	1,330	1,340
CLCN1	1,300	1,310	1,320	1,330	1,340
Frame 1	T G G G T A A A G C A T G T G G G T G A C C C T G A A A G C C T G G G C C G G T C A G C T G T G	W V K H V G D P E S L G R S A V			
Miot. to CLCN...	A C A C A T G G G T A A A G C A T G T G G G T G A C C C T G A A A G C C T G G G C C G G T C A G	T H G * S M W V T L K A W A G Q			
WT to CLCN1 c...	T G G G T A A A G C A T G T G G G T G A C C C T G A A A G C C T G G G C C G G T C A G C T G T G	W V K H V G D P E S L G R S A V			



	1,540	1,550	1,560	1,570	1,580
CLCN1 Frame 1	G A T G A C A T C A T C T A C A A G A T C C T A C C T G G A G G C T A T G C G G T A A T T G G G				
Miot. to CLCN...	T A T T T G A T G A C A T C A T C T A C A A G A T C C T A C C T G G A G G C T A T G C G G T A A				
WT to CLCN1 c...	G A T G A C A T C A T C T A C A A G A T C C T A C C T G G A G G C T A T G C G G T A A T T G G G				
Frame 1	D D I I Y K I L P G G Y A V I G				
	1,590	1,600	1,610	1,620	1,630
CLCN1 Frame 1	G C A G C A G C G C T G A C C G G T G C A G T A T C C C A C A C A G T C T C C A C A G C T G T G				
Miot. to CLCN...	T T G G G G C A G C A G C G C T G A C C G G T G C A G T A T C C C A C A C A G T C T C C A C A G				
WT to CLCN1 c...	G C A G C A G C G C T G A C C G G T G C A G T A T C C C A C A C A G T C T C C A C A G C T G T G				
Frame 1	A A A L T G A V S H T V S T A V				
	1,640	1,650	1,660	1,670	1,680
CLCN1 Frame 1	A T T T G C T T C G A A T T A A C G G G T C A G A T T G C C C A C A T C C T G C C C A T G A T G				
Miot. to CLCN...	C T G T G A T T T G C T T C G A A T T A A C G G T C A G A T T G C C C A C A T C C A C A T C C T G C C C A				
WT to CLCN1 c...	A T T T G C T T C G A A T T A A C G G G T C A G A T T G C C C A C A T C C T G C C C A T G A T G				
Frame 1	I C F E L T G Q I A H I L P M M				
	1,690	1,700	1,710	1,720	
CLCN1 Frame 1	G T G G C T G T C A T C T T G G C C A A C A T G G T G G C T C A G A G C C T G C A G C C C T C C				
Miot. to CLCN...	T G A T G G T G G C T G T C A T C T T G G C C A A C A T G G T G G C T C A G A G C C T G C A G C				
WT to CLCN1 c...	G T G G C T G T C A T C T T G G C C A A C A T G G T G G C T C A G A G C C T G C A G C C C T C C				
Frame 1	V A V I L A N M V A Q S L Q P S				



	1,930	1,940	1,950	1,960
CLCN1	1,930	1,940	1,950	1,960
Frame 1	G A T T C T A A A G A T T C T A T G A T C C T G C T G G G C T C C G T G G A G C G C T C A G A G	D S K D S M I L L G S V E R S E		
Miot. to CLCN...	T G G T T G A T T C T A A A G A T T C T A T G A T C C T G C T G G G C T C C G T G G A G C G C T	W L I L K I L * S C W A P W S A		
WT to CLCN1 c...	G A T T C T A A A G A T T C T A T G A T C C T G C T G G G C T C C G T G G A G C G C T C A G A G	D T T S T A A G D T T S T A T M G A T I C T L G C T G G G C T C S C G T V G A G C R C T C S A G A E		
	1,970	1,980	1,990	2,000
CLCN1	1,970	1,980	1,990	2,000
Frame 1	C T A C A G T C C C T C C T G C A G C G C C A C T T G G G C C C T G A G C G G A G G C T G C G G	L Q S L L Q R H L G P E R R L R		
Miot. to CLCN...	C A G A G C T A C A G T C C C T C C T G C A G C G C C A C T T G G G C C C T G A G C G G A G G C	Q S Y S P S C S A T W A L S G G		
WT to CLCN1 c...	C T A C A G T C C C T C C T G C A G C G C C A C T T G G G C C C T G A G C G G A G G C T G C G G	L Q S L L Q R H L G P E R R L R		
	2,020	2,030	2,040	2,050
CLCN1	2,020	2,030	2,040	2,050
Frame 1	G T G G C C C A G G A C A T G G C C A G G A A G T T G T C T G A G C T G C C C T A C G A T G G G	V A Q D M A R K L S E L P Y D G		
Miot. to CLCN...	T G C G G G T G G C C C A G G A C A T G G C C A G G A A G T T G T C T G A G C T G C C C T A C G	C G W P R T W P G S C L S C P T		
WT to CLCN1 c...	G T G G C C C A G G A C A T G G C C A G G A A G T T G T C T G A G C T G C C C T A C G A T G G G	V A Q D M A R K L S E L P Y D G		
	2,070	2,080	2,090	2,100
CLCN1	2,070	2,080	2,090	2,100
Frame 1	A A G G G A C A C C A A G G C A T C T C A C C C G A G G G C C G A A G G G A G T C C T T T G C C	K G H Q G I S P E G R R E S F A		
Miot. to CLCN...	A T G G G A A G G G A C A C C A A G G C A T C T C A C C C G A G G G C C G A A G G G A G T C C T	M G R D T K A S H P R A E G S P		
WT to CLCN1 c...	A A G G G A C A C C A A G G C A T C T C A C C C G A G G G G C C G A A G G G A G T C C T T T G C C	K G H Q G I S P E G R R E S F A		

		2,120		2,130		2,140		2,150		2,160
CLCN1		2,120		2,130		2,140		2,150		2,160
Frame 1		T T T G T G G A T G A G G A T G A A G A T G A G G A C C T C T C T G G G A A G C C C G A G C T G								
		F V D E D E D E D L S G K P E L								
Miot. to CLCN...		T T G C C T T T G T G G A T G A G G A T G A A G A T G A G G A C C T C T C T G G G A A G C C C G								
Frame 1		L P L W M R M K M R T S L G S P								
WT to CLCN1 c...		T T T G T G G A T G A G G A T G A A G A T G A G G A C C T C T C T G G G A A G C C C G A G C T G								
Frame 1		F V D E D E D E D L S G K P E L								
		2,170		2,180		2,190		2,200		
CLCN1		2,170		2,180		2,190		2,200		
Frame 1		C C T C C T C T T C C T C C T C C T C A C C C C T T A C C A T C T G C C C C A T T G T C C T C T								
		P P L P P P H P L P S A P L S S								
Miot. to CLCN...		A G C T G C C T C C T C T T C C T C C T C A C C C C T T A C C A T C T G C C C C A T T G T								
Frame 1		S C L L F L L L T P Y H L P H C								
WT to CLCN1 c...		C C T C C T C T T C C T C C T C C T C A C C C C T T A C C A T C T G C C C C A T T G T C C T C T								
Frame 1		P P L P P P H P L P S A P L S S								
		2,210		2,220		2,230		2,240		2,250
CLCN1		2,210		2,220		2,230		2,240		2,250
Frame 1		G A A G A G T C C A A T G G G C C C C T G C C C A G C C A C A A A C A G C A G C C A G A A G C A								
		E E S N G P L P S H K Q Q P E A								
Miot. to CLCN...		C C T C T G A A G A G T C C A A T G G G C C C C T G C C C A G C C A C A A A C A G C A G C C A G								
Frame 1		P L K S P M G P C P A T N S S Q								
WT to CLCN1 c...		G A A G A G T C C A A T G G G C C C C T G C C C A G C C A C A A A C A G C A G C C A G A A G C A								
Frame 1		E E S N G P L P S H K Q Q P E A								
		2,260		2,270		2,280		2,290		2,300
CLCN1		2,260		2,270		2,280		2,290		2,300
Frame 1		C C G G A G C C T G C A G A T C A A A G A C C C T C T G T C T T T C G G T C C C T G C T G C G C								
		P E P A D Q R P S V F R S L L R								
Miot. to CLCN...		A A G C A C C G G A G C C T G C A G A T C A A A G A C C C T C T G T C T T T C G G T C C C T G C								
Frame 1		K H R S L Q I K D P L S F G P C								
WT to CLCN1 c...		C C G G A G C C T G C A G A T C A A A G A C C C T C T G T C T T T C G G T C C C T G C T G C G C								
Frame 1		P E P A D Q R P S V F R S L L R								

	2,310	2,320	2,330	2,340	2,350
CLCN1 Frame 1	T G C T T A C T T G G C A G A C C T C G C C C C A C G A A G A A G A A A C A A C C C A G G A G				
Miot. to CLCN...	T G C G C T G C T T A C T T G G C A G A C C T C G C C C C A C G A A G A A G A A A C A A C C C				
WT to CLCN1 c...	T G C T T A C T T G G C A G A C C T C G C C C C A C G A A G A A G A A A C A A C C C A G G A G				
	2,360	2,370	2,380	2,390	2,400
CLCN1 Frame 1	T C A A T G G A T T T A G T G G A C A A C A T G T C A C C T G A A G A G A T C G A G G C C T G G				
Miot. to CLCN...	A G G A G T C A A T G G A T T T A G T G G A C A A C A T G T C A C C T G A A G A G A T C G A G G				
WT to CLCN1 c...	T C A A T G G A T T T A G T G G A C A A C A T G T C A C C T G A A G A G A T C G A G G C C T G G				
	2,410	2,420	2,430	2,440	
CLCN1 Frame 1	G A A C A G G A G C A G C T G A G C C A G C C T G T C T G T T T T G A C T A C T G C T G C A T C				
Miot. to CLCN...	C C T G G G A A C A G G A G C A G C T G A G C C A G C C T G T C T G T T T T G A C T A C T G C T				
WT to CLCN1 c...	G A A C A G G A G C A G C T G A G C C A G C C T G T C T G T T T T G A C T A C T G C T G C A T C				
	2,450	2,460	2,470	2,480	2,490
CLCN1 Frame 1	G A C C A A T C C C C C T T C C A G C T G G T G G A G C A G A C G T C C C T G C A C A A G A C C				
Miot. to CLCN...	G C A T C G A C C A A T C C C C C T T C C A G C T G G T G G A G C A G A C G T C C C T G C A C A				
WT to CLCN1 c...	G A C C A A T C C C C C T T C C A G C T G G T G G A G C A G A C G T C C C T G C A C A A G A C C				

	2,500	2,510	2,520	2,530	2,540
CLCN1 Frame 1	C A C A C G C T C T T C T C G C T C C T T G G C C T C C A C C T T G C C T A T G T G A C C A G C				
Miot. to CLCN1... Frame 1	A G A C C C A C A C G C T C T T C T C G C T C C T T G G C C T C C A C C T T G C C T A T G T G A				
WT to CLCN1 c... Frame 1	C A C A C G C T C T T C T C G C T C C T T G G C C T C C A C C T T G C C T A T G T G A C C A G C				
	2,550	2,560	2,570	2,580	2,590
CLCN1 Frame 1	A T G G G G A A G C T C A G G G G C G T G C T G G C A T T G G A G G A G C T G C A G A A G G C C				
Miot. to CLCN1... Frame 1	C C A G C A T G G G G A A G C T C A G G G G C G T G C T G G C A T T G G A G G A G C T G C A G A				
WT to CLCN1 c... Frame 1	A T G G G G A A G C T C A G G G G C G T G C T G G C A T T G G A G G A G C T G C A G A A G G C C				
	2,600	2,610	2,620	2,630	2,640
CLCN1 Frame 1	A T C G A G G G G C A C A C C A A G T C T G G G G T G C A G C T C C G C C C T C C C C T G G C C				
Miot. to CLCN1... Frame 1	A G G C C A T C G A G G G G C A C A C C A A G T C T G G G T G C A G C T C C G C C C T C C C C				
WT to CLCN1 c... Frame 1	A T C G A G G G G C A C A C C A A G T C T G G G T G C A G C T C C G C C C T C C C C T G G C C				
	2,650	2,660	2,670	2,680	
CLCN1 Frame 1	A G C T T C C G G A G C A C G A C T T C C A C T C G G A A G A A T C C G G G A G G C C C A C C C				
Miot. to CLCN1... Frame 1	T G G C C A G C T T C C G G A G C A C G A C T T C C A C T C G G A A G A A T C C G G G A G G C C				
WT to CLCN1 c... Frame 1	A G C T T C C G G A G C A C G A C T T C C A C T C G G A A G A A T C C G G G A G G C C C A C C C				

	2,690	2,700	2,710	2,720	2,730
CLCN1 Frame 1	C C T C C C A C C G A G G C C T G G A G T C T G C C T G A G G A T G G A A C T G G G G C T C C T				
Miot. to CLCN...	C A C C C C C C T C C C A C C G A G G C C T G G A G C C T G C C T G A G G A T G G A A C T G G G G				
WT to CLCN1 c...	C C T C C C A C C G A G G C C T G G A G C C T G C C T G A G G A T G G A A C T G G G G C T C C T				
	2,740	2,750	2,760	2,770	2,780
CLCN1 Frame 1	G C C T C C C C A G A G C C C C C C G C A C C C T C C C C C T C C C C A G C T C C C T G C T C				
Miot. to CLCN...	C T C C T G C C T C C C C A G A G C C C C C C G C A C C C T C C C C C T C C C C A G C T C C C T				
WT to CLCN1 c...	G C C T C C C C A G A G C C C C C C G C A C C C T C C C C C T C C C C A G C T C C C T T G C T C				
	2,790	2,800	2,810	2,820	2,830
CLCN1 Frame 1	T C T G A G G C T C C A G C C A A A G T G G A G G T G A G C T G G A G G A G C T G G A G C T G				
Miot. to CLCN...	T G C T C T C T G A G G C T C C A G C C A A A G T G G A G G G T G A G C T G G A G G A G C T G G				
WT to CLCN1 c...	T C T G A G G C T C C A G C C A A A G T G G A G G G T G A G C T G G A G G A G C T G G A G C T G				
	2,840	2,850	2,860	2,870	2,880
CLCN1 Frame 1	G G A G A G A G T C C A G G G C T G G A G G A G G A G C T C G C T G A C A T C C T G C A G G G C				
Miot. to CLCN...	A G C T G G G A G A G A G T C C A G G G C T G G A G G A G G A G C T C G C T G A C A T C C T G C				
WT to CLCN1 c...	G G A G A G A G T C C A G G G C T G G A G G A G G A G C T C G C T G A C A T C C T G C A G G G C				

		2,890		2,900		2,910		2,920		
CLCN1		2,890		2,900		2,910		2,920		
Frame 1		C C A A G T C T G C G A T C C A C G G A T G A G G A G G A C G A G G A C G A G C T G A T T C T T		P S L R S T D E E D E L I L						
Miot. to CLCN...		A G G G C C C A A G T C T G C G A T C C A C G G A T G A G G A G G A C G A G G A C G A G C T G A		R R A Q V C D P R M R R T R T S *						
WT to CLCN1 c...		C C A A G T C T G C G A T C C A C G G A T G A G G A G G A C G A G G A C G A G C T G A T T C T T		P S L R S T D E E D E L I L						
Frame 1										
		2,930		2,940		2,950		2,960		2,970
CLCN1		2,930		2,940		2,950		2,960		2,970
Frame 1		T G A C G G C C T C C A G G A T C T C C T C T T A A A G A C C G T T C C G G G G C C C A G G C C		* R P P G S P L K D R S G A Q A						
Miot. to CLCN...		T T C T T T T G A C G G C C T C C A G G A T C T C C T C T T A A A G A C C G T T C C G G G G C C C		F F D G L Q D L L L K T V P G P						
WT to CLCN1 c...		T G A C G G C C T C C A G G A T C T C C T C T T A A A G A C C G T T C C G G G G C C C A G G C C		* R P P G S P L K D R S G A Q A						
Frame 1										
		2,980		2,990		3,000		3,010		3,020
CLCN1		2,980		2,990		3,000		3,010		3,020
Frame 1		A G A G G C T G G A C T T G T G T G T C A G G G G T A T G T C C T G A A G T T G G A G A C C T C		R G W T C V S G V C P E V G D L						
Miot. to CLCN...		A G G C C A G A G G C T G G A C T T G T G T G T C A G G G G T A T G T C C T G A A G T T G G A G		R P E A G L V C Q G Y V L K L E						
WT to CLCN1 c...		A G A G G C T G G A C T T G T G T G T C A G G G G T A T G T C C T G A A G T T G G A G A C C T C		R G W T C V S G V C P E V G D L						
Frame 1										
		3,030		3,040		3,050		3,060		3,070
CLCN1		3,030		3,040		3,050		3,060		3,070
Frame 1		A C A C C A T C G C C C C T T C T G G G A A T C T T A A A A T G T G A T A G T G A T		T P S P W P L L G I L K C D S D						
Miot. to CLCN...		A C C T C A C A C C A T C G C C C T G G C C C C T T C T G G G A A T C T T A A A A T G T G A T A		T S H H R P G P F W E S * N V I						
WT to CLCN1 c...		A C A C C A T C G C C C C T T C T G G G A A T C T T A A A A T G T G A T A G T G A T		T P S P W P L L G I L K C D S D						
Frame 1										

