

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
Faculdade de Veterinária  
Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias

Glicogenose hereditária em gado Brahman no Brasil

Priscila Zlotowski

PORTO ALEGRE

2005

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

Faculdade de Veterinária

Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias

Glicogenose hereditária em gado Brahman no Brasil

Priscila Zlotowski

Dissertação apresentada como requisito para obtenção do grau de mestre em Ciências Veterinárias, na área de concentração em Patologia Veterinária, na Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Orientador: Prof. Dr. David Driemeier

## AGRADECIMENTOS

Aos meus pais Máximo e Rejane, pelo amor, carinho e compreensão sempre dedicados.

Aos meus avós, Darci e Leyla, pelo exemplo de respeito aos animais e amor e dedicação à profissão.

Ao orientador David pelo exemplo de persistência e dedicação.

Aos colegas do setor de patologia veterinária da UFRGS: Marília, Ângela, Édson, Anderson, Sandra, André, Milene, Carol, Dani, Cláudio, Titi, Vivian, Camila, Djeison, Mauro, Paulo, Vacaria e Xênia que ao longo destes anos tornaram-se verdadeiros amigos.

Ao veterinário Luciano Nakazato, do Centro de Biotecnologia da UFRGS, pelo auxílio na técnica de PCR.

Ao prof. Dr. Eduardo Juan Gimeno da Universidad Nacional de La Plata, Argentina, pelo auxílio nos exames de histoquímica das lectinas.

Ao prof. Severo Sales de Barros, da Faculdade de Veterinária da Universidade Federal de Pelotas, pelo auxílio em microscopia eletrônica de transmissão.

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE TABELAS.....</b>	<b>5</b>
<b>LISTA DE ILUSTRAÇÕES.....</b>	<b>6</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>10</b>
<b>1 - INTRODUÇÃO.....</b>	<b>12</b>
<b>2 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>14</b>
2.1 - IMPORTÂNCIA DO ESTUDO DE DOENÇAS HEREDITÁRIAS EM BOVINOS.....	14
2.2 - DEFEITOS CONGÊNITOS EM BOVINOS NO RIO GRANDE DO SUL .....	15
2.3 - DOENÇAS DO ARMAZENAMENTO DE GLICOGÊNIO .....	15
2.4 - DOENÇA DE ACÚMULO LISOSSOMAL .....	18
2.4.1 - <i>Classificação das doenças de acúmulo lisossomal</i> .....	20
2.4.2 - <i>Doenças do armazenamento lisossomal hereditárias</i> .....	20
2.4.3 - <i>Doenças do armazenamento lisossomal adquiridas</i> .....	22
2.4.4 - <i>Diagnóstico de doenças de acúmulo lisossomal</i> .....	23
2.4.5- <i>Importância do estudo das doenças de acúmulo lisossomal em animais</i> .....	24
2.5 - GLICOGENOSE TIPO II .....	25
2.5.1 - <i>Sinais clínicos</i> .....	26
2.5.2 - <i>Achados de necropsia</i> .....	27
2.5.3 - <i>Achados histopatológicos</i> .....	27
2.5.4 - <i>Microscopia eletrônica de transmissão</i> .....	27
2.5.5 - <i>Histoquímica de lectinas</i> .....	28
2.5.6 - <i>Técnica da reação de polimerase em cadeia (PCR)</i> .....	28
2.5.7 - <i>Diagnóstico</i> .....	29
2.5.8 - <i>Diagnóstico diferencial</i> .....	30
2.5.9 - <i>Controle, tratamento e profilaxia</i> .....	31
<b>3 - MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>32</b>
3.1 – EPIDEMIOLOGIA E SINAIS CLÍNICOS.....	32
3.2 – PATOLOGIA MACROSCÓPICA.....	32
3.3 – PATOLOGIA MICROSCÓPICA .....	33
3.4 - MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO.....	34
3.5 - HISTOQUÍMICA DE LECTINAS .....	34
3.6 - REAÇÃO EM CADEIA DE POLIMERASE (PCR) .....	35
<b>4 - RESULTADOS .....</b>	<b>38</b>
4.1 - EPIDEMIOLOGIA .....	38
4.2 - SINAIS CLÍNICOS .....	38
4.3 - ACHADOS DE NECROPSIA .....	40
4.4 - LESÕES HISTOLÓGICAS .....	41
4.5 - MICROSCOPIA ELETRÔNICA .....	49
4.6 - HISTOQUÍMICA DE LECTINAS .....	50
4.7 - REAÇÃO DE POLIMERASE EM CADEIA .....	51
<b>5 – DISCUSSÃO .....</b>	<b>54</b>
<b>6 - CONCLUSÕES.....</b>	<b>60</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>61</b>

## **LISTA DE TABELAS**

Tabela 1 - Doenças de acúmulo lisossomal hereditárias em humanos e animais. ....	20
Tabela 2 - Órgãos coletados na necropsia e analisados na microscopia óptica. ....	32
Tabela 3 - Lectinas utilizadas para diagnóstico de Glicogenose generalizada tipo II em gado Brahman. ....	35
Tabela 4 - Identificação dos animais que foi coletado sangue para detecção de heterozigotos. ....	35
Tabela 5 – Total de animais nascidos e total de animais afetados no período de ocorrência da enfermidade. ....	38
Tabela 6 - Intensidade das lesões nos tecidos analisados. ....	48
Tabela 7 - Distribuição e intensidade de vacuolização nas regiões de encéfalo analisadas. ....	49
Tabela 8 - Distribuição e intensidade da coloração de PAS nos encéfalos controle.....	49

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1- Rotas do metabolismo do glicogênio. Marcações com asterisco assinalam as enzimas deficientes associadas com doenças do armazenamento de glicogênio....	18
Figura 2 – Bovino cruza Brahman, com diagnóstico de glicogenose generalizada apresentando fraqueza muscular.....	39
Figura 3 - Bovino cruza Brahman, com diagnóstico de glicogenose generalizada apresentando apatia.....	39
Figura 4 - Bovino cruza Brahman, com diagnóstico de glicogenose generalizada apresentando dificuldade para levantar após queda.....	40
Figura 5 – Bovino cruza Brahman com diagnóstico de glicogenose generalizada (primeiro plano) e bovinos normais com a mesma idade.....	40
Figura 6 – Bovino Brahman com glicogenose hereditária. Musculatura esquelética. A. Vacuolização acentuada da musculatura esquelética (Obj. 40, HE). B. Necrose de fibra muscular associada á infiltrado mononuclear (Obj. 40, HE).....	41
Figura 7 – Bovino Brahman com glicogenose tipo II. Musculatura cardíaca. A. Vacuolização acentuada na musculatura cardíaca (Obj. 20, HE). B. Musculatura cardíaca de um bovino controle (Obj. 20, HE). C. Grânulos PAS positivos na musculatura cardíaca (Obj. 40, PAS).....	42
Figura 8 – Bovino Brahman com glicogenose tipo II. Musculatura cardíaca. A. Vacuolização acentuada das fibras de Purkinje e musculatura cardíaca (Obj. 20, HE). B. Grânulos PAS positivos nas fibras de Purkinje e musculatura cardíaca (Obj. 20, PAS).....	43
Figura 9 – Bovino Brahman com glicogenose tipo II, seção 1, óbex: vacuolização e distensão do citoplasma neuronal (Obj. 20, HE).....	44
Figura 10 – Bovino Brahman com glicogenose tipo II seção 2, cerebelo: vacuolização acentuada em neurônio de Golgi da camada de células granulares (Obj. 40, HE). 45	45
Figura 11 – Bovino Brahman com glicogenese tipo II. Intestino: vacuolização e distensão citoplasmática de neurônios do plexo mioentérico e musculatura lisa (Obj. 40, HE).....	45
Figura 12 – Bovino Brahman com glicogenose tipo II. Gânglio trigêmio: grânulos PAS positivos em neurônios vacuolizados. (Obj. 40, PAS).....	46
Figura 13 – Bovino Brahman com glicogenose tipo II. Pele: vacuolização dos músculos piloerectores (Obj. 40, HE).....	46
Figura 14 – Bovino Brahman com glicogenose tipo II. Epidídimo: vacuolização das células epiteliais (Obj. 40, HE). ....	47
Figura 15 - Esfregaço sangüíneo de bovino Brahman afetado com glicogenose tipo II. Vacuolização em célula mononuclear.....	48
Figura 16 - Musculatura esquelética de bovino Brahman com glicogenose tipo II. Acúmulo de glicogênio no sarcoplasma delimitado por membrana (cabeça de seta) e em glicogenolisossomos (setas grandes). Mitocôndrias distendidas, com partículas de glicogênio na matriz (setas pequenas) (ME, 10.500 x).....	50
Figura 17 – Bovino Brahman com glicogenose tipo II, musculatura lisa de vaso: histoquímica das lectinas, forte marcação com GS-II (Obj. 40).....	51
Figura 18- Genotipificação pela PCR e digestão com Bgl I para 1057ΔTA. S1 a S5 sangue de bovinos clinicamente sadios da propriedade afetada e T1 a T3 tecido de animais clinicamente afetados e confirmados através da histopatologia. Os	

materiais S1,S2, S3 e S5 são heterozigotos, e T1, T2 e T3 são homozigotos recessivos. Somente S4 é homozigoto selvagem. .... 52

Figura 19- Genotipificação pela PCR e digestão com BsiEI para o alelo 1783T. S1 a S5 sangue de bovinos clinicamente sadios da propriedade afetada e T1 a T3 tecido de animais clinicamente afetados confirmados através da histopatologia. A banda 116pb é discriminatória para o alelo 1783T, logo todos os bovinos analisados são homozigotos ..... 52

Figura 20 - Genotipificação pela PCR e digestão com Bgl I para o alelo 1351T. S1 a S5 sangue de bovinos clinicamente sadios da propriedade afetada e T1 a T3 tecido de animais clinicamente afetados e confirmados através da histopatologia. C é o produto da PCR sem a enzima de restrição. As bandas 81pb e 66pb são discriminatórias para o alelo 1351C, logo todos os bovinos são homozigotos. **Erro! Indicador não definido.**

## RESUMO

Descreve-se uma enfermidade hereditária em bovinos caracterizada por acúmulo lisossomal de glicogênio em diversos órgãos. A doença foi diagnosticada em um rebanho da raça Brahman com 20 vacas e um touro, mantidos em criação extensiva, no município de Porto Lucena, Rio Grande do Sul, Brasil. A doença afetou 3 de 16 bezerros nascidos (18,75%) no ano 2000, 5 de 19 (26,3%) em 2001 e 2 de 12 (16,6%) em 2002. Os animais afetados, após 1 mês de idade, apresentavam dificuldade de acompanharem a mãe e crescimento retardado, desenvolviam fraqueza e tremores musculares, letargia e perda de condição corporal progressivos. Com o agravamento dos sinais clínicos os animais eram eutanasiados por apresentarem dificuldade em se alimentar ou beber água sem auxílio. Todos os bezerros eram descendentes do mesmo touro. Após a retirada deste animal do plantel e introdução de um touro Nelore não houve o nascimento de animais doentes.

Foi realizada necropsia em 3 bezerros doentes e palidez muscular do tronco e membros foi a única alteração macroscópica encontrada. Vacuolização citoplasmática de diversos órgãos foi a principal alteração histológica observada. Os vacúolos citoplasmáticos eram mais evidentes na musculatura esquelética, miocárdio, especialmente nas fibras de Purkinje e neurônios do Sistema Nervoso Central (SNC). Nos tecidos mais afetados, também foi observada grande quantidade de grânulos ácido periódico de Schiff (PAS) positivos e negativos quando o tecido era tratado previamente com diastase.

A microscopia eletrônica de transmissão mostrou acúmulo anormal de glicogênio livre no citoplasma das células ou envolto por membrana na musculatura esquelética, neurônios do SNC e fígado.

As amostras processadas de pele, musculatura esquelética e tecido nervoso na histoquímica de lectinas apresentaram reação com as lectinas *Griffonia simplicifolia* (GS-II) e *Concanavalina ensiformes* (Con-A).

Uma mutação letal no gene da alfa glicosidase ácida, causadora da glicogenose generalizada em bovinos da raça Brahman, a 1057 $\Delta$ TA, foi detectada pela técnica de reação em cadeia de polimerase (PCR) em tecidos dos animais necropsiados. Também foi detectada presença dessa mutação no gene da alfa glicosidase ácida, através da análise de amostra de sangue, de animais que tem parentesco com bezerros que nasceram com a doença.



Os achados clínicos, patológicos e ultra-estruturais são semelhante às descrições de glicogenose tipo II em bovinos da raça Brahman.

Até o momento não há casos descritos de glicogenose tipo II em bovinos da raça Brahman no Brasil. O diagnóstico de glicogenose hereditária foi baseado nos dados epidemiológicos, sinais clínicos, achados histológicos e ultra-estruturais, histoquímica de lectinas e pelos resultados de PCR.

## ABSTRACT

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA

Author: Priscila Zlotowski

Adviser: David Driemeier

Title: Inherited glycogenosis in Brahman cattle in Brazil.

Master Dissertation in Veterinary Medicine, major in veterinary pathology, Porto Alegre, RS.

### INHERITED GLYCOGENOSIS IN BRAHMAN CATTLE IN BRAZIL

*It is described an inherited disease in cattle characterized by lysosomal storage of glycogen in several tissues. The disease was diagnosed in a Brahman herd with 20 cows and 1 bull maintained in an extensive grazing system, in the municipality of Porto Lucena, Rio Grande do Sul, Brazil. The disease affected 3 of 16 borned calves (18,75%) in the year of 2000, 5 of 19 (26,3%) in 2001 and 2 of 12 (16,6%) in 2002. Affected animals, after one month of age showed difficult in follow the mother, retarded growth, muscular weakness and tremors, lethargy and poor body condition. Because of the inability to eat or drink unassisted and because the progressive deterioration of their clinical condition the affected calves were euthanatized. All affected calves were sired by the same bull. The use of a Nelore bull in the subsequent breeding season solved the immediate problem in this herd.*

*Necropsy was performed on three affected calves. The only gross lesion detected was paleness of the skeletal muscles of the trunk and limbs. Cytoplasmic vacuoles were the main histological lesion. Vacuoles were particularly evident in skeletal muscles, myocardium and Purkinje fibers, neurons of the brain and spinal cord. Large amounts of PAS positive granules were also observed in these most affected tissues. Pretreatment with diastase completely abolished the PAS reactivity.*

*Electron microscopy revealed that glycogen was free within the cytoplasm or accumulated in membrane bound granules in striated muscles, neurons of the central nervous system and liver.*

*Skin, striated muscle and nervous tissue were marked with the lectins Griffonia simplicifolia (GS-II) and Concanavalina ensiformes (Con-A).*

*The 1057 $\Delta$ TA, a lethal mutation in the gen of the alpha acid glucosidase, that cause generalized glycogenosis in Brahman cattle was detected by PCR in paraffin embedded tissues of necropsied animals. This mutation was also detected, by blood analysis, in animals that are relatives of sicked borned calves.*

*Clinical and ultrastructural findings were similar to previous descriptions of generalized glycogenosis in Brahman cattle.*

*Up to this date there were no described cases of generalized glycogenosis in Brazil. The diagnosis of inherited generalized glycogenosis was based in epidemiological datas, clinical signs, ultrastructural findings and lectin-histochemistry and were confirmed by PCR results.*

## 1 - INTRODUÇÃO

Glicogenoses são síndromes hereditárias nas quais há defeito enzimático no metabolismo de carboidratos dando as células um aspecto espumoso. Neurônios, hepatócitos, leucócitos e células tubulares renais são especialmente afetadas (CHEVILLE, 1988). A glicogenose mais característica conhecida e protótipo de doença lisossomal é a glicogenose tipo II, também conhecida como deficiência da enzima 1-4  $\alpha$ -glicosidase, doença do acúmulo de glicogênio tipo II ou doença de Pompe. Esta doença foi relatada em humanos (POMPE apud EDWARDS & RICHARDS 1979), cães (WALVOORT, 1985), gatos (SANDSTROM et al., 1969), codorna japonesa (MATSUI et al., 1983), ovelha (MANKTELOW & HARTLEY, 1975) e bovinos das raças Brahman e Shorthorn (O'SULLIVAN et al., 1981).

A glicogenose tipo II é uma doença autossômica recessiva, causada pela deficiência da enzima 1-4  $\alpha$ -glicosidase (WISSELER et al., 1993). A consequência desta deficiência é o acúmulo de glicogênio nos lisossomos das células de diversos órgãos. Quando há a ausência de alguma enzima que participe do processo de degradação lisossomal, ou esta enzima se encontra inoperante, a substância que seria degradada se acumula no interior dos lisossomos. Morfologicamente, este acúmulo é reconhecido pela presença de vacúolos ou material granular no interior das células, envoltos por uma membrana. Os vacúolos são vistos quando o material acumulado é solúvel em água ou nos solventes utilizados na preparação dos cortes histológicos (SUMMERS et al., 1995).

A glicogenose tipo II é bem conhecida nos humanos e se apresenta como duas síndromes clínicas, o tipo infantil e a de desenvolvimento tardio. A forma infantil é progressiva, de evolução rápida e fatal durante o primeiro ano de vida. Nesta forma da doença há aumento de tamanho cardíaco e morte devida à falência cardíaca. A forma tardia pode se apresentar na infância ou na vida adulta. Os sinais clínicos principais desta síndrome são miopatia, fraqueza e emagrecimento, mas há ausência ou pouca alteração cardíaca macroscópica (HOWELL et al., 1981). Em bovinos da raça Brahman, estes sinais clínicos são notados a partir dos 2 a 3 meses de idade, com péssima condição corporal e letargia. Os bezerros afetados apresentam ataxia e hiperestesia desenvolvendo tremores musculares, estes sinais pioram progressivamente e os animais morrem geralmente ao redor dos 9 meses de idade (O'SULLIVAN et al., 1981). As

principais alterações microscópicas encontradas nesta doença são acúmulo de glicogênio na maioria dos tecidos, principalmente na musculatura esquelética, miocárdio e cérebro (HOWELL et al., 1981).

Diversas doenças do acúmulo lisossomal são de origem genética, afetando todas as células do organismo nas quais o gene em questão codifica a enzima inoperante ou deficiente (SUMMERS et al., 1995). Glicogenose tipo II é descrita em bovinos da raça Brahman associada com a perda de função de alelos, afetando o gene da  $\alpha$ -glicosidase (JOLLY, 2002). Sendo uma doença autossômica recessiva, a identificação dos animais heterozigotos, que não apresentam alterações clínicas, é a principal maneira de prevenir a disseminação no rebanho (HEALY et al., 1987).

Existem, também, doenças do acúmulo lisossomal induzidas, associadas ao consumo de plantas tóxicas. Estas doenças incluem a intoxicação com *Castanospermum australe* (REICHMANN et al., 1987), *Swainsona* spp. (HARTLEY, 1971), *Sida carpinifolia* (DRIEMEIER et al., 2000), *Astragalus* spp (VAN KAMPEN, 1972), *Oxytropis* spp, *Ipomoea carnea* (TOKARNIA et al., 1960), *Solanum fastigiatum* (RIET-CORREA et al., 1983) e *Solanum kwebense* (PIENAAR, 1977).

Assim como as demais doenças do acúmulo lisossomal, a glicogenose hereditária de bovinos da raça Brahman pode servir de modelo experimental para essas patologias em humanos. Análises das alterações morfológicas de tecidos provenientes de animais doentes permitem uma melhor compreensão dos mecanismos fisiopatológicos da doença, facilitando o desenvolvimento de métodos diagnósticos para estas doenças (JOLLY & WALKLEY, 1997).

A raça Brahman foi introduzida recentemente no Brasil, com a primeira importação da raça em 1994. A partir daí a raça está em constante crescimento no país. Características como tolerância ao calor e a temperaturas baixas, resistência a insetos, facilidade de parto, bom desempenho reprodutivo (marca da adaptação ambiental do Brahman) e resistência à doenças têm contribuído para o crescimento da raça no país.

No Brasil não há casos descritos em literatura indexada, de glicogenose hereditária em bovinos. O objetivo do presente trabalho foi descrever os primeiros casos de glicogenose hereditária em bovinos da raça Brahman ocorridos em uma propriedade no município de Porto Lucena, Rio Grande do Sul nos anos de 2000, 2001 e 2002. Foram analisados e descritos os aspectos epidemiológicos, clínicos e patológicos desta doença.

## **2 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

### **2.1 - Importância do Estudo de Doenças Hereditárias em Bovinos**

Doenças genéticas afetando raças de bovinos são relativamente comuns e podem ser economicamente importantes em alguns rebanhos específicos. (JOLLY, 2002).

Doenças fenotípicas resultantes de mutações que envolvem enzimas catalíticas são na sua maioria recessivas. É provável que em bovinos defeitos dominantes especialmente aqueles com alta penetrância, isto é, com grande capacidade e regularidade de expressar-se fenotipicamente, sejam rapidamente identificados e medidas apropriadas sejam tomadas para reduzir seu impacto na produtividade. Em contraste, uma mutação responsável por um defeito recessivo pode ser amplamente difundida antes de ser expressa. Desta forma, muito tempo poderá passar antes do problema ser identificado como hereditário (HEALY, 1996).

Mutações múltiplas são comuns em doenças genéticas humanas e são responsáveis por variações na idade e curso clínico da doença. Esta heterogenicidade não tem sido descrita em medicina veterinária, em que uma única mutação é esperada para a maioria das doenças genéticas que afetam rebanhos. Isto ocorre porque as raças tiveram seu desenvolvimento em regiões geográficas localizadas de um número relativamente pequeno de animais fundadores e foram depois desenvolvidas por programas controlados baseados no pedigree. Devido a isso, possuem menor diversidade genética do que a maioria das populações humanas. A raça Brahman, uma raça antiga do subcontinente indiano não foi desenvolvida da mesma maneira que as raças européias e parece exceção (JOLLY, 2002). Esta raça teve sua origem nos Estados Unidos, por volta de 1900, e foi desenvolvida a partir de quatro raças, Guzerá, Nelore, Gir e Krishna Valley. O plantel norte americano foi composto por animais importados principalmente da Índia e também do Brasil (Retirado de: Associação de criadores de gado Brahman do Brasil).

Conhecimentos atuais do genoma e genética biomédica permitem que muitas doenças genéticas de animais sejam definidas em termos genético-moleculares e bioquímicos de forma relativamente simples, bem como o desenvolvimento de testes para controle das mesmas. Mapeamento genético, com o objetivo de controlar doenças genéticas, tem um maior potencial de ser desenvolvido em medicina veterinária do que

humana devido a questões éticas. Isto porque a criação de animais é controlada, há um curto intervalo de tempo entre gerações e o melhoramento genético de uma raça pode ser bastante influenciado pela natureza hierárquica da criação animal, com a maioria dos reprodutores utilizados em uma raça pertencentes a uma pequena população conhecida através do pedigree. Além disso, o uso de inseminação artificial pode rapidamente difundir as mudanças genéticas, principalmente em bovinos (HEALLY, 1996).

Defeitos congênitos são anormalidades de estrutura ou função presentes desde o nascimento. Podem afetar uma única estrutura anatômica ou função, todo um sistema, partes de diversos sistemas ou ambos, estrutura e função. Os defeitos congênitos ocorrem em consequência de fatores de natureza genética, fatores ambientais ou pela intervenção de ambos, agindo em um ou mais estágios do desenvolvimento fetal (LEIPOLD & DENNIS, 1980).

As maiorias dos defeitos congênitos hereditários conhecidos são transmitidas por genes recessivos autossômicos, que resultam no nascimento de animais defeituosos, cujos progenitores são normais. Os genes recessivos são a mais importante forma de transmissão hereditária de enfermidades. Estes genes são transmitidos de geração em geração pelos indivíduos heterozigotos (SCHILD, 2001).

## **2.2 - Defeitos Congênitos em Bovinos no Rio Grande do Sul**

No Rio Grande do Sul as malformações congênitas mais freqüentemente observadas podem ser classificadas como de ocorrência esporádica, caracterizadas, geralmente, por deformações múltiplas que afetam principalmente os sistemas músculo-esquelético e nervoso dos animais, cuja etiologia não é determinada, incluindo hidrocefalia, hidranencefalia, microcefalia, dicefalia, espinha bífida, aprosopia, agnatia, braguinatia, fenda palatina, atresia anal e malformações cardíacas; enfermidades hereditárias causadas por genes recessivos autossômicos como hipermetria hereditária em bovinos Shorthorn, acondroplasia na raça Jersey, artrogripose em bovinos da raça Holandês e enfermidades hereditárias causadas por genes dominantes de penetrância incompleta como o caso de hipoplasia linfática na raça Hereford (SCHILD, 2001).

## **2.3 - Doenças do Armazenamento de Glicogênio**

Doenças do armazenamento de glicogênio são distúrbios hereditários recessivos autossômicos caracterizados por deficiência de várias enzimas envolvidas na síntese e

degradação de glicogênio (KING & ALROY, 2000, PLATT & WALKLEY, 2004). O significado da deficiência de uma enzima específica é melhor entendido através da compreensão do metabolismo normal do glicogênio (Figura 1).

Como é bem conhecido, o glicogênio é a forma de armazenamento da glicose e representa um mecanismo metabolizável rápido desta fonte energética. Os principais depósitos de glicogênio são encontrados no fígado e músculo esquelético, embora a maioria das outras células possa armazenar quantidades pequenas. A função do glicogênio muscular é servir como reserva para a síntese de ATP durante a contração muscular enquanto o glicogênio hepático mantém a glicemia, particularmente nos estágios iniciais de jejum. O glicogênio é sintetizado a partir de moléculas de glicose, e é composto por ligações ramificadas e lineares. A síntese e degradação de glicogênio dependem de enzimas específicas para degradar os dois tipos de ligações, e estas enzimas estão presentes no músculo e no fígado (CHAMPE e HARVEY, 1996). Uma pequena quantidade do glicogênio também é continuamente degradada nos lisossomos pela maltase ácida. Se os lisossomos são deficientes nesta enzima, o glicogênio contido nestes torna-se não acessível à degradação pelas enzimas citoplasmáticas como as fosforilases (KUMAR et al., 1999).

Foram descritos oito tipos diferentes de doenças do armazenamento de glicogênio em seres humanos; elas são designadas como tipos I até VIII. Quatro dessas glicogenoses foram descritas em animais (KING & ALROY, 2000):

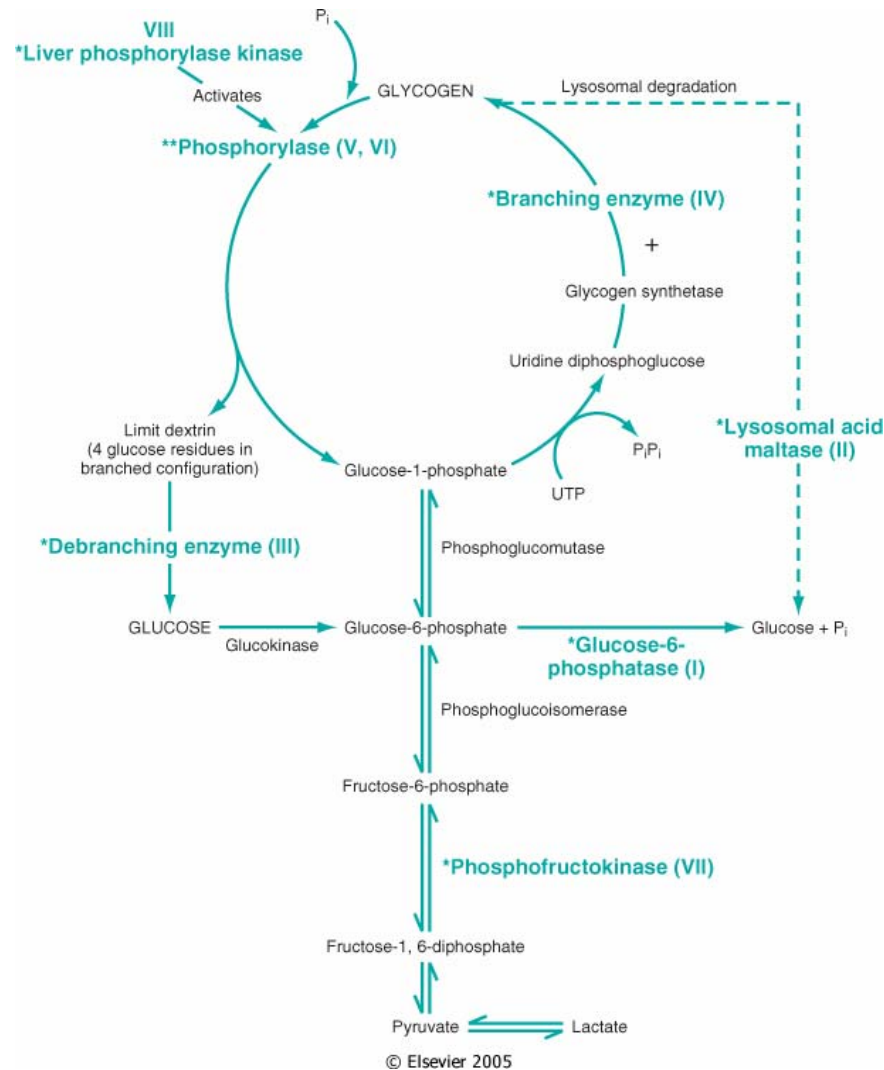
Glicogenose tipo II, também conhecida como doença de Pompe, é causada por uma deficiência da maltase ácida lisossômica. Esta doença já foi relatada em humanos, ovelhas, cães, gatos, codorna japonesa e bovinos das raças Shorthorn e Brahman. Ao contrário das outras glicogenoses, nesta doença o glicogênio se acumula no interior dos lisossomos da maioria das células do corpo, mas principalmente no cérebro, músculos e fígado.

A glicogenose tipo III, ou doença de Cori, resulta da deficiência da enzima desramificadora do glicogênio, amilo-1,6-glicosidase, envolvida na hidrólise do glicogênio até glicose. A deficiência leva ao acúmulo de grandes quantidades de partículas livres de glicogênio no citosol principalmente de hepatócitos, mas também no miocárdio, na musculatura esquelética, na musculatura lisa e nos neurônios. Ocorrem hepatomegalia e hipoglicemia em animais acometidos por esta doença. Esta doença foi descrita em cães da raça Pastor Alemão.



Glicogenose tipo IV foi descrita em gatos da raça Norwegian Forest. Como ocorre na doença em seres humanos, os gatos homocigotos para este traço apresentam deficiência da enzima ramificadora de glicogênio, o que leva ao acúmulo anormal de grandes quantidades de glicogênio em muitos tecidos, mas particularmente nos músculos esqueléticos e no miocárdio. Os filhotes afetados podem nascer mortos ou morrer logo após o nascimento. Os que sobrevivem podem ter um aspecto normal nos primeiros 5 a 7 meses e depois desse período ocorrem degeneração e atrofia progressivas da musculatura esquelética e do miocárdio, ocorrendo morte por volta dos 12 a 14 meses de idade.

A glicogenose tipo VII é causada por deficiência do tipo M (músculo) da fosfofrutoquinase (PFK), tendo sido descrita em cães da raça Springer Spaniel Inglês. A doença é herdada como um traço recessivo autossômico. Os cães afetados sofrem uma persistente anemia hemolítica compensada e episódios de hemólise intravascular com hemoglobinúria. Os sinais clínicos são intolerância ao exercício, atrofia muscular, e raramente câimbras musculares. Os cães afetados possuem apenas 1% a 6% da atividade da PFK muscular normal, e 10% a 20% da atividade da PFK eritrocitária normal. As concentrações musculares de glicogênio atingem aproximadamente o dobro dos níveis normais. As fibras musculares afetadas exibem uma coloração mais pálida que as fibras normais, contendo depósitos de polissacarídeo similar a amilopectina e positivo para o PAS, imediatamente por sob o sarcolema.



**Figura 1-** Rotas do metabolismo do glicogênio. Marcações com asterisco assinalam as enzimas deficientes associadas com doenças do armazenamento de glicogênio.

Fonte: KUMAR et al., 1999.

## 2.4 - Doença de Acúmulo Lisossomal

Lisossomos são organelas presentes no citoplasma de todas as células, responsáveis pelo catabolismo de constituintes celulares e materiais extracelulares, que entram no sistema vacuolar por processos de endocitose ou autofagia (SUMMERS et al., 1995). São equipados com hidrolases ácidas, responsáveis pela quebra da maioria dos polímeros biológicos, como proteínas, polissacarídeos e glicolípídios em unidades monômeras de aminoácidos, monossacarídeos e lípidios simples (JOLLY et al., 1977). O lisossomo é o centro primário de depósito e reciclagem das células. A degradação das

macromoléculas celulares e extracelulares é reutilizada na síntese celular (WARREN & ALROY, 2000).

Doenças de acúmulo lisossomal é um grupo de doenças hereditárias ou adquiridas com diferentes manifestações clínicas, afetando mamíferos e pássaros (WARREN & ALROY, 2000). Geralmente são observados dois tipos de mudanças nas doenças de acúmulo lisossomal. As mudanças primárias são consequência direta do acúmulo anormal de substratos ou catabólitos nos lisossomos. As mudanças secundárias são resultantes de reciclagem interrompida e são manifestadas em produtos celulares e extracelulares anormais. As consequências fisiológicas de ambos os processos, primários e secundários, são frequentemente similares, apesar do fato de defeitos genéticos e substratos armazenados serem específicos de cada doença. Desta forma, diferentes doenças de acúmulo lisossomal desenvolvem apresentação clínica similar (WARREN & ALROY 2000). As consequências da falta de atividade de uma enzima lisossomal específica no funcionamento lisossomal é parcialmente conhecida. As dimensões do lisossomo aumentam consideravelmente nas doenças de acúmulo lisossomal. Enquanto o volume aumenta o pH intra lisossomal deve ser mantido baixo para assegurar o funcionamento adequado das enzimas lisossomais. Com este aumento do volume intra lisossomal ocorre um aumento gradual do pH interno do lisossomo, e assim um declínio na atividade das enzimas lisossomais não afetadas (HESSELINK et al., 2003).

Muitas doenças do acúmulo lisossomal são transmitidas como características autossômicas recessivas e representam mutações gênicas específicas. O defeito no genoma do hospedeiro varia entre as muitas doenças do acúmulo lisossomal. Enquanto deleção gênica resulta em falha na síntese de enzimas, mutação leva à produção de enzimas defeituosas. Algumas condições similares clínicas e patológicas são adquiridas pela exposição a substâncias neurotóxicas que inibem atividades lisossomais específicas. Como para a maioria das funções biológicas, níveis normais destas hidrolases excedem níveis mínimos, portadores heterozigotos, com aproximadamente a metade da atividade enzimática de animais normais não demonstram sinais clínicos. Animais afetados homozigotos normalmente possuem atividade residual, de 2% á 5% do normal, e tais níveis severos de depleção resultam em acúmulo de substrato e apresentação de sinais clínicos (SUMMERS et al., 1995).

#### 2.4.1 - Classificação das doenças de acúmulo lisossomal

As doenças de acúmulo lisossomal podem ser classificadas dependendo da rota afetada e da natureza do substrato acumulado. Dez diferentes deficiências podem afetar a degradação de mucopolissacarídeos, cinco defeitos são conhecidos nas rotas de degradação das glicoproteínas, uma para o acúmulo intralisossomal de glicogênio e oito deficiências afetando o catabolismo de esfingolipídios (GIESELMANN, 1995).

Em humanos foram descritas mais de 40 doenças hereditárias de acúmulo lisossomal geneticamente determinadas, e em animais há 30 condições nas quais a atividade da enzima deficiente foi documentada e relatada (WARREN & ALROY, 2000).

#### 2.4.2 - Doenças do armazenamento lisossomal hereditárias

A tabela 1 resume as doenças de acúmulo lisossomal hereditárias, a deficiência enzimática primária, os principais órgãos envolvidos e a doença correspondente em animais.

**Tabela 1** - Doenças de acúmulo lisossomal hereditárias em humanos e animais.

<b>Doença</b>	<b>Hidrolase deficiente</b>	<b>Órgãos principais envolvidos</b>	<b>Doença correspondente em animais</b>
<b>Mucopolissacaridoses (MPS)</b>			
MPS I (Síndromes de Hurler e Schele)	$\alpha$ -iduronidase	SNC, tecido conjuntivo, coração, esqueleto, córnea	Gatos DPC, cão Plott Hound
MPS II Síndrome de Hunter	Iduronato Sulfatase	SNC, tecido conjuntivo, coração, esqueleto	Retriever do Labrador
MPS III Síndrome de Sanfilippo			
Subtipo A	Heparan N-sulfatase	SNC	Dachshund pêlo duro
Subtipo B	N-acetil-alfa-glucosaminidase	SNC	Emú
Subtipo D	N-acetilglicosamina 6-sulfatase	SNC	Cabras Anglo Nubiana
MPS VI Síndrome Maroteaux Lamy	Arilsulfatase B N-acetilgalactosamina 4-sulfatase	Esqueleto, córnea, coração	Gatos DPC e Siamês, rato, Schnauzer Miniatura, Pinscher Miniatura, Welshi Corgi
MPS VII Síndrome Sly	$\beta$ - glicuronidase	SNC, tecido conjuntivo, esqueleto, coração	Cães, ratos, gatos DPC, camundongo Gus

<b>Glicocerebrosidase</b> (Doença de Gaucher) – Tipo 2 infantil	$\beta$ -glicocerebrosidase	SNC, baço, fígado, medula óssea	Silky terrier, ovelha, suíno
Leucodistrofia metacromática	Arilsulfatase A	SNC, fígado, rim, vesícula biliar	Ganso havaiano
<b>Doença de Niemann- Pick</b>			
Tipo A	Esfingomielinase	SNC, fígado, baço, medula óssea	Poodle Miniatura, mutante do camundongo C57BL/KsJ
Tipo B	Desconhecida	Baço, medula óssea	Camundongo BALB/c
Tipo C		SNC, fígado e baço	Camundongo FM
<b>G<sub>M1</sub>-gangliosidose</b>			
Forma infantil	$\beta$ - galactosidase	SNC, esqueleto, vísceras	Gatos DPC, Korat, Siamês, Springer Spaniel Inglês, Cão d'água Português
Forma juvenil	$\beta$ – galactosidase.	SNC, vísceras	Bovinos Friesian, gatos Siamês e DPC, Beagle, Huskies do Alasca, ovinos cruza Suffolk
<b>G<sub>M2</sub>-gangliosidose</b>			
Doença de Tay-Sachs variante A	$\beta$ -hexosaminidase A	SNC	Cervo Muntjac
Doença de Sandhoff	$\beta$ -hexosaminidase A e B	SNC	Gatos DPC e Angorá, Pointer Alemão pelo curto, Spaniel japonês e suíno Yorkshire
<b>Lipidose galactosilceramida</b>			
Leucodistrofia de células globóides (Doença de Krabbe)	Galactosilcerebrosida, $\beta$ - galactosidase	SNC	Cairn Terrier, West Highland Terrier, Poodle, Beagle, Bluetick hound, camundongo Twitcher, ovelha Poller Dorset, gato DPC, macaco Rhesus Periquito Sheel, Rato Donryu, Fox Terrier
Doença de Wolman	Lipase ácida/colesterol esterase	Fígado, baço, adrenal	
<b>Lipofuscinose ceróide neuronal (NCL)</b>			
NCL Infantil (CLN 1)	Proteína esterase palmitol	SNC, coração, células endoteliais	Ovelha da Suécia

NCL Variante infantil tardia (CLN 6)	Desconhecida	SNC, coração células endoteliais	Ovelhas Rambouillet, Hampshire South, Seter Inglês, Pastor Australiano azul, Devon, gato DPC
<b>Desordens de degradação glicoprotéica</b>			
$\alpha$ -Manosidose	$\alpha$ -manosidase	SNC, esqueleto, fígado, baço	Angus, Shorthorn, Galloway, Murray Grey, gato DPC, DLH e Persa, Cobaio
$\beta$ -Manosidose	$\beta$ -manosidase	SNC, esqueleto, fígado, baço	Anglo Nubiana, Saler bov
Galactosialidose	Catepsina A, $\beta$ - galactosidase, $\alpha$ - neuraminidase	SNC, esqueleto, fígado, baço	Schipperke
<b>Doenças do armazenamento de glicogênio</b>			
Doença de Pompe	$\alpha$ -glicosidase (maltase ácida)	SNC, músculo, coração	Brahman e Shorthorn, cão Lapland, ovino Corriedale, Codorna japonesa

Adaptado de WARREN & ALROY, 2000.  
DPC: doméstico pelo curto.

#### 2.4.3 - Doenças do armazenamento lisossomal adquiridas

As doenças do armazenamento adquiridas ocorrem após intoxicações por plantas, acúmulo de ferro e acúmulo de cobre de origem exógena (CARLTON & McGAVIN, 1998).

As plantas que causam doenças do armazenamento possuem substâncias que inibem a ação de diferentes enzimas lisossomais causando o acúmulo de conteúdo que seria normalmente degradado por esta enzima (JOLLY et al, 1977).

Plantas dos gêneros *Swainsona* (HUXTABLE & DORLING, 1982), *Astragalus*, *Oxytropis* (MOLYNEAUX & JAMES, 1982) e *Sida carpinifolia* (COLODEL et al., 2002), contém swainsonina, um inibidor enzimático da manosidase lisossômica, causando acúmulo de oligossacarídeos nas células, conferindo aspecto vacuolizado, principalmente às células do sistema nervoso central.

No caso da intoxicação por *Castanospermum australe* a enzima deficiente é a  $\alpha$ -glicosidase ácida, a mesma responsável pela glicogenose dos bovinos da raça Brahman

de origem genética sendo importante o diagnóstico diferencial entre estas duas patologias que apresentam a mesma alteração bioquímica, mas são de origens diferentes (REICHMANN et al., 1987).

#### 2.4.4 - Diagnóstico de doenças de acúmulo lisossomal

Na maioria das doenças de acúmulo lisossomal o diagnóstico específico pode ser estabelecido pela demonstração da atividade da enzima deficiente no plasma, leucócitos ou cultura de fibroblastos. No entanto, há diversas doenças de acúmulo lisossomal nas quais nem a natureza do material acumulado ou o defeito enzimático são conhecidos. A situação é complicada pela ocorrência de pseudodeficiência de hidrolases lisossomais em muitos indivíduos que permanecem clinicamente assintomáticos (WARREN & ALROY, 2000).

Os tipos de células afetadas pelas doenças do armazenamento variam conforme a doença, no entanto, algumas células estão mais predispostas a serem afetadas do que outras. Células com longa vida após a mitose, como neurônios, são mais afetadas; desta forma a maioria das doenças do armazenamento são acompanhadas por distúrbios neurológicos. Outro fator principal que determina o tipo de célula envolvida é a disponibilidade da substância não digerida na célula em questão (JOLLY et al., 1977).

As doenças de acúmulo lisossomal possuem diversas características clínicas e epidemiológicas em comum, que podem ser auxiliares para a determinação de um diagnóstico presuntivo destas doenças (SUMMERS et al., 1995):

- muitas são doenças hereditárias autossômicas recessivas de pais heterozigotos clinicamente normais. De um cruzamento de pais portadores, pode ser esperado 25% de homozigose com doença clínica nos filhos;

- o índice de suspeita é aumentado se uma raça específica, na qual uma doença do acúmulo lisossomal ocorre está envolvida. O histórico pode indicar doenças semelhantes nas progênes anteriores dos mesmos pais;

- pode haver histórico de morte neonatal. Além disso, animais afetados, se viáveis, são propensos a apresentarem crescimento retardado se comparados com irmãos fenotipicamente normais da mesma ninhada;

- com algumas exceções, os animais doentes são normais ao nascimento e desenvolvem sinais clínicos lentamente nas primeiras semanas ou meses de vida. Esses sinais clínicos refletem, na maioria das vezes, distúrbios neurológicos e incluem ataxia, tremores, mudanças de comportamento, convulsões e cegueira.

- a análise do pedigree normalmente incrimina um reprodutor, seus irmãos ou progênie direta. Isto porque determinados reprodutores são muitas vezes utilizados indiscriminadamente em programas de cruzamento natural ou artificial principalmente em cães, gatos e bovinos. Além disso, com a disponibilidade da transferência de embriões e o movimento internacional de animais, doenças de acúmulo lisossomal podem ser introduzidas em países nos quais elas não haviam sido previamente identificadas.

#### 2.4.5- Importância do estudo das doenças de acúmulo lisossomal em animais

Doenças de acúmulo lisossomal de animais têm sido de grande importância para as pesquisas biomédicas (JOLLY & WALKLEY, 1997). Muitas doenças animais do metabolismo glicoprotéico tem sido descobertas e constituem-se como modelos importantes para o entendimento das doenças similares que ocorrem em humanos (MICHALSKI & KLEIN, 1999).

Alguns exemplos da importância do estudo destas doenças em animais para os avanços na área médica podem ser citados. O estudo da alfa manosidose bovina possibilitou a descoberta de que a intoxicação por Swainsonina é uma forma induzida de alfa manosidose (HUXTABLE & DORLING, 1982; JOLLY, 1974) facilitando o entendimento da glicolisação de proteínas. A existência de defeitos hereditários na degradação lisossomal em gatos domésticos, para os quais uma grande quantidade de dados fisiológicos e morfológicos está disponível, tem fornecido uma excelente oportunidade para explorar mecanismos patogênicos relacionados a disfunções neurológicas nestas doenças. (JOLLY & WALKLEY, 1997).

A criação de camundongos “Knock-out” modelo de doença do acúmulo lisossomal tipo II (doença de Pompe) tem sido empregada para auxiliar no entendimento da patogênese desta doença, que apesar de ser conhecida há vários anos ainda apresenta questões a serem esclarecidas. A necessidade de um modelo animal versátil para testar a eficácia de terapias inovadoras desenvolvidas, como terapia gênica e enzimática é outro fator importante no emprego destes modelos animais (BIJVOET et al., 1998). Codorna japonesa, espécie animal em que foi descrita Doença de Pompe, têm sido utilizada no estudo da eficácia da terapia enzimática no tratamento desta doença, como possibilidade do uso desta terapia para a doença de Pompe em humanos (KIKUCHI, 1998).



## 2.5 - Glicogenose Tipo II

Glicogenose tipo II ou doença de Pompe é uma doença autossômica recessiva que foi descrita em humanos, bovinos das raças Shorthorn e Brahman, cães da raça Lapland (WALVOORT, 1985), gatos, ovelhas e codorna japonesa (MATSUI et al., 1983). Deficiência da alfa glicosidase ácida é o defeito primário que leva ao acúmulo de glicogênio nos lisossomos (WISSELAR et al., 1993).

Existem poucas informações na natureza clínica da doença no gato, cão e ovelha. No entanto, a doença é bem conhecida e relatada em humanos, e pode ser dividida em três diferentes formas clínicas. A forma clássica ou infantil ocorre no primeiro ano de vida e geralmente está associada com fraqueza muscular, sem atrofia. Na maioria dos casos cardiomegalia está presente com morte resultando de insuficiência cardiorrespiratória. Casos infantil tardio e juvenil da doença em humanos causa dificuldade em andar seguida de doença muscular progressiva. Na forma adulta há uma perda progressiva da musculatura esquelética (EDWARDS & RICHARDS, 1979). O glicogênio é depositado em diversos tecidos, mas especialmente na musculatura esquelética, miocárdio e cérebro. As características comuns a todas as formas de glicogenose tipo II são a presença de excessiva quantidade de glicogênio citoplasmático, quantidades variáveis de glicogênio envolvido por membrana associadas à uma deficiência de  $\alpha$ -glicosidase (HOWELL et al., 1981).

Esta doença é caracterizada pela ocorrência de mutações no gene da enzima, que impedem parcialmente ou completamente a biossíntese da  $\alpha$ -glicosidase e conseqüentemente a degradação lisossomal de glicogênio (BIJVOET et al., 1998). A variação fenotípica na doença de Pompe é melhor explicada por diferentes níveis residuais de atividade enzimática. O fenótipo clínico é bastante influenciado pela combinação de alelos mutantes e nos níveis resultantes de atividade residual da alfa glicosidase. Pessoas com a forma infantil da doença apresentam pouca atividade enzimática, enquanto pacientes mais velhos, ou moderadamente afetados apresentam níveis de atividade enzimática em torno de 25% do valor controle. Pacientes com a forma infantil possuem armazenamento massivo em muitos tecidos, incluindo coração, musculaturas esquelética e lisa, fígado, rins sistema nervoso central e periférico. Na forma de desenvolvimento tardio o acúmulo de glicogênio é predominante na musculatura esquelética, com acúmulo mínimo ou ausente nos outros tecidos (GIESELMANN, 1995).

Na glicogenose bovina tipo II as duas formas clínicas estão presentes. A deficiência da enzima é causada por um ponto de mutação ou microdeleção/inserção no gene da  $\alpha$ -glicosidase ácida que interfere com a expressão ou estabilidade do RNA mensageiro (WISSELMAN et al., 1993).

É difícil fazer uma comparação entre as formas da doença em humanos e bovinos de outra maneira do que em achados patológicos. Tenta-se relacionar a doença em termos de idade de surgimento e maturidade sexual de bezerros e crianças, jovens e adultos. Nesta classificação a doença em bovinos parece ser expressa como duas entidades distintas, clínica e patológica, comparadas às formas infantis e de desenvolvimento tardio vistas em humanos (HOWELL et al., 1981). O desenvolvimento da doença precedendo a puberdade e a expectativa de vida de menos de 12 meses, sugere que a doença nos Brahman é semelhante à forma juvenil da doença em humanos (REICHMANN et al., 1993). No entanto, Cook (1982) descreveu cardiomegalia, congestão venosa crônica hepática e edema pulmonar em dois animais que morreram com 3 e 7 meses de idade, caracterizando a forma infantil da doença vista em humanos em bovinos da raça Brahman.

Bovinos afetados são letárgicos, apresentam andar incoordenado e tremores musculares. Esses animais morrem 8 à 9 meses após o nascimento. As principais alterações histológicas são vacuolização do miocárdio e das musculaturas esquelética e lisa. É observada também vacuolização neuronal (O'SULLIVAN, 1981). Glicogenose generalizada em bovinos da raça Brahman pode afetar animais de ambos os sexos. Machos e fêmeas podem ser heterozigotos e a frequência de animais afetados não difere entre os sexos (HOWELL J. MCC et al., 1981).

### 2.5.1 - Sinais clínicos

Os sinais clínicos são percebidos em bezerros ao redor dos 2 a 3 meses de idade, e se caracterizam por perda de condição corporal, crescimento retardado, se comparado aos animais da mesma idade, e letargia. Os animais tornam-se incoordenados e quando são manejados apresentam excitação e hiperestesia. Após o desmame há uma piora rápida dos sinais clínicos. A incoordenação torna-se mais pronunciada, aparecem tremores musculares e quando excitados, os animais caem permanecendo na mesma posição por algum tempo e apresentando dificuldade em se levantar. A maioria dos bezerros é sacrificada ou morre de causas acidentais com cerca de 9 meses de vida (O'SULLIVAN et al., 1981). Em estágios tardios da doença os bezerros adotam uma

posição de cavalete desenvolvendo um arco côncavo do pescoço e apresentam olhos fundos, ocasionalmente é notada uma aparente fraqueza da língua (REICHMANN et al., 1993).

#### 2.5.2 - Achados de necropsia

Não são encontradas lesões macroscópicas significativas em animais com glicogenose tipo II (O'SULLIVAN et al., 1981), no entanto, pode haver, em alguns casos, palidez da musculatura esquelética (REICHMANN et al., 1993).

Foi descrito por Edwards e Richards em 1979 um leve aumento, dilatação ventricular e hipertrofia no coração de bezerros que morreram de glicogenose tipo II, bem como áreas pálidas multifocais extensas no miocárdio na base do coração. Cook et al, em 1982 observou cardiomegalia, congestão venosa crônica do fígado e pulmões edematosos em animais que morreram com 3 e 7 meses de idade.

#### 2.5.3 - Achados histopatológicos

O exame histológico de material proveniente de animais doentes caracteriza-se pela vacuolização do citoplasma celular em diversos tecidos. As lesões mais acentuadas no SNC são vacuolização do citoplasma de neurônios, principalmente em neurônios do núcleo maior, na base do cérebro e nos cornos laterais da medula espinhal. As fibras de Purkinje do coração apresentam-se tumefeitas e vacuolizadas, contendo grande quantidade de material PAS positivo o qual é digerido com tratamento prévio pela diastase. Fibras do miocárdio e musculatura esquelética são marcadamente vacuolizadas. São também observados vacúolos em hepatócitos, epitélio tubular renal, epitélio glandular da tireóide, musculatura lisa dos intestinos, rúmen e abomaso e em células ganglionares da retina (O'SULLIVAN et al., 1981).

#### 2.5.4 - Microscopia eletrônica de transmissão

A análise ultra-estrutural de casos de glicogenose tipo II mostra, nos tecidos analisados grande quantidade de glicogênio em vacúolos cercados por membrana que parecem derivar de lisossomos. Muitos desses vacúolos podem estar bastante aumentados, particularmente nos músculos e cérebro. Algumas células podem mostrar desorganização citoplasmática que parece estar relacionada com a presença de grandes vacúolos rompidos contendo glicogênio (HOWELL et al; 1981).

A maioria dos neurônios no sistema nervoso central e autônomo dos animais afetados encontra-se tumefeitos e com grande quantidade de grânulos livres no citoplasma ou em vacúolos. A densidade dos grânulos de glicogênio no interior dos vacúolos é variada; alguns vacúolos apresentam-se intensamente preenchidos por glicogênio, enquanto que em outros o glicogênio encontra-se mais disperso. Em neurônios mais severamente afetados a quantidade de substância de Nissl reconhecida é bastante reduzida se comparada com animais não afetados, mas núcleo, mitocôndria, complexo de Golgi e outras organelas são usualmente normais. Os dendritos dos neurônios afetados freqüentemente contêm glicogênio intracitoplasmático livre e ocasionalmente em vacúolos e algumas vezes observa-se edema do retículo endoplasmático rugoso. Astrócitos e seus processos contêm mais glicogênio do que o normal, sendo que em alguns, principalmente naqueles adjacentes aos capilares, o glicogênio está densamente localizado em vacúolos, que podem ser bastante grandes. Inclusões tipo lipídio são encontradas em alguns astrócitos. Glicogênio está presente, também, em oligodendrócitos (COOK et al., 1982).

#### 2.5.5 - Histoquímica de lectinas

As lectinas são um grupo heterogêneo de proteínas ou hidratos de carbono unidos à proteínas de origem não imune (GOLDSTEIN *et al.* 1980; GOLDSTEIN & HAYES, 1978), que possuem a habilidade de reconhecer e unir-se com alta especificidade de forma reversível à hidratos de carbono incluídos dentro de glicoconjugados. Colorações com glicoconjugados em cortes de tecidos animais embebidos em parafina permitem a identificação de resíduos de carboidratos nas glicoproteínas ou oligossacarídeos que estão retidos no corte, permitindo a caracterização da doença do armazenamento (ALROY et al., 1984; DAMJANOV, 1987; WARREN & ALROY, 2000).

As lectinas *Griffonia simplicifolia* II (GSA II) e *Concanavalia ensiformis* (Con A) tem sido úteis para a demonstração de glicogênio *in situ* em cortes de diversos tecidos embebidos em parafina. (HENNIGAR et al., 1986; SPICER & SCHULTE, 1988; ITO et al., 1990).

#### 2.5.6 - Técnica da reação de polimerase em cadeia (PCR)

Glicogenose em bovinos da raça Brahman é consequência da síntese defeituosa de polipeptídeos da  $\alpha$ -glicosidase ácida, resultante da terminação prematura da tradução

causada por duas mutações separadas: uma estrutura resultante de uma deleção de um dinucleotídeo no exon 7(1057 $\Delta$ TA) e uma transição de citosina para timina no exon 13 (1783C $\rightarrow$ T), criando códons parados nos éxons 8 e 13 respectivamente. Além disso, diversas variantes de nucleotídeos únicos existem na seqüência do código da  $\alpha$ -glicosidase ácida de bovinos Brahman. Resultados de um estudo de expressão in vivo indicam que uma dessas variantes, uma transição de citosina para timina no exon 9 (1351C $\rightarrow$ T) é responsável por 70% a 80% da redução da atividade da alfa glicosidase ácida (DENNIS et al., 2002).

Recentemente, testes de PCR têm sido desenvolvidos para genotipagem de bovinos da raça Brahman para os três alelos com perda de função no gene da  $\alpha$ -glicosidase ácida. A utilização deste ensaio de PCR baseado em restrição enzimática facilita a seleção precisa contra os alelos 1057 $\Delta$ TA e 1783T, conseqüentemente, reduzindo a prevalência de glicogenose em rebanhos registrados e comerciais de Brahman (DENNIS et al., 2002).

#### 2.5.7 - Diagnóstico

A demonstração bioquímica da deficiência da alfa glicosidase ácida e/ou a evidência histológica de tecidos vacuolizados contendo glicogênio corado com PAS fornece um diagnóstico definitivo de glicogenose generalizada na maioria dos casos analisados (REICHMANN et al., 1993). Em um estudo realizado por Reichmann et al. em 1993, o diagnóstico presuntivo da doença foi feito baseado na presença de vacuolização em células de tecidos como cérebro e musculatura esquelética e cardíaca em bezerros jovens tipo Brahman que desenvolveram sinais clínicos típicos.

A análise de esfregaço sangüíneo corado com PAS mostra-se um teste à campo eficiente no diagnóstico de glicogenose generalizada. Esfregaço sangüíneo corado pela técnica do PAS mostra grânulos de glicogênio, alguns associados à vacúolos citoplasmáticos em linfócitos dos animais afetados (REICHMANN et al., 1993).

A avaliação da atividade da enzima alfa glicosidase ácida nas células mononucleares do sangue e de fibroblastos é um método utilizado para confirmação da doença e identificação dos animais heterozigotos (DENNIS et al., 2002). Nestes a atividade enzimática é de aproximadamente 50% da encontrada nos animais normais (O'SULLIVAN et al., 1981). Os resultados deste método podem não ser verdadeiros, devido a presença de plantas que possuem um inibidor da alfa glicosidase ácida

(REICHMANN et al., 1987). Em humanos a determinação da atividade da alfa glicosidase ácida em esfregaço de sangue tem se mostrado um método diagnóstico prático e não invasivo para a identificação de doença de Pompe (UMAPATHYSIVAM et al., 2001).

A definição das mutações responsáveis pela glicogenose bovina através de métodos da biologia molecular, como a PCR torna-se mais eficiente para identificação destes animais heterozigotos, pois se evitam as complicações com fatores ambientais, que afetam a atividade da enzima quantificada (DENNIS et al., 2000).

#### 2.5.8 - Diagnóstico diferencial

As alterações histológicas que ocorrem na glicogenose são semelhantes àquelas vistas na alfa-manosidose bovina e na intoxicação com *Swainsona*, *Astragalus*, *Oxytropis*, *Sida carpinifolia*, *Ipomoea carnea*, *Solanum fastigiatum* e *Solanum kwebense*. No entanto, marcada vacuolização nas fibras musculares esqueléticas e cardíacas ou acentuado edema e vacuolização das fibras de Purkinje do coração, que é característico na glicogenose generalizada em bovinos, não é descrita na  $\alpha$ -manosidase bovina (O'SULLIVAN et al., 1981). Vacuolização citoplasmática de linfócitos ocorre em ambas as formas de deficiência de  $\alpha$ -manosidase, a hereditária e a induzida por swainsonina. Entretanto, o distúrbio neurológico que é a característica principal da deficiência de  $\alpha$ -manosidase rapidamente a distingue da glicogenose generalizada. Além disso, intoxicação por *Swainsona*, assim como as outras plantas citadas, pode afetar animais de todas as idades e raças e há evidências do consumo da planta (REICHMANN et al., 1993).

O consumo de sementes de *Castanospermum australe* causa a inibição, por ação de um alcalóide indolizidínico da alfa glicosidase lisossomal, e de um número de outras enzimas. Estimação da  $\alpha$ -glicosidase em linfócitos é a base para um teste preditivo do genótipo para doença de Pompe em bovinos, no entanto, esta enzima é também inibida pelo consumo de sementes de *Castanospermum australe* e pode causar falso diagnóstico do genótipo para esta doença, sendo importante a diferenciação entre estas duas formas da deficiência da  $\alpha$ -glicosidase (REICHMANN et al., 1987; REICHMANN et al., 1989). Em estudos realizados por Reichmann et al. em 1989, em animais que receberam sementes de *Castanospermum australe*, não foi observado vacuolização ou acúmulo de glicogênio na análise histopatológica.

Outras doenças que causam fraqueza muscular em bovinos também devem ser incluídas no diagnóstico diferencial de glicogenose generalizada, entre elas, deficiência de vitamina E e Selênio, intoxicação por monensina e plantas tóxicas como *Cássia occidentalis*, *Solanum malacoxylon*, *Trisetum* sp. e *Cestrum* sp (RADOSTITS et al, 2002). Miastenia congênita foi descrita em bovinos da raça Brahman causando fraqueza muscular progressiva, que inicia em animais entre 3 e 4 semanas de idade. Animais clinicamente afetados apresentam dificuldade para se levantar após queda e impossibilidade de se manter em estação sem auxílio. No entanto, o estudo histológico da musculatura desses animais não revelou alterações (KRANER, 2002). Glicogenose generalizada é, dentre as causas citadas que levam a fraqueza muscular em bovinos, a única em que se observam as fibras musculares intensamente vacuolizadas associado a vacuolização generalizada nos demais tecidos na análise histológica.

#### 2.5.9 - Controle, tratamento e profilaxia

Não há tratamento específico para esta doença em animais. A presença da glicogenose em um rebanho bovino pode causar grande perda econômica para o produtor (DENNIS, et al., 2002). É de fundamental importância que em propriedades onde haja animais clinicamente afetados por esta doença sejam identificados e retirados dos serviços de reprodução os animais heterozigotos recessivos (HEALY et al., 1987). Deve, também, ser dada atenção aos touros doadores de sêmen das centrais de inseminação. Esta prática de manejo representa uma importante forma de disseminação rápida da doença caso haja um touro heterozigoto nestas centrais, sendo fundamental testar previamente estes animais (DENNIS, et al., 2002).

### 3 - MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 – Epidemiologia e Sinais Clínicos

Os dados epidemiológicos e clínicos foram obtidos através de visitas realizadas na propriedade onde a enfermidade foi diagnosticada.

#### 3.2 – Patologia macroscópica

Foram realizadas duas necropsias pela equipe do Setor de Patologia Veterinária (SPV) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) em dois animais identificados como N-617/01 e N-432/02. Um bezerro, identificado como AP-578/01 foi necropsiado pelo veterinário que prestava assistência à prefeitura do município onde ocorreram os casos, e o material foi enviado ao SPV para exame macroscópico e histológico. Para exame histológico, fragmentos de diversos tecidos foram coletados e fixados em formol 10% (Tabela 2).

**Tabela 2** - Órgãos coletados na necropsia e analisados na microscopia óptica.

	N-617/01	N-439/02	AP-578/01
Musc. Cardíaca	•	•	•
Musc. Esquelética	•	•	•
Diafragma	•	•	•
Língua	•	•	•
Tireóide	•	•	•
Intestino	•	•	NA
Trigêmio	•	•	•
Fígado	•	•	•
Rim	•	•	NA
Pele	•	•	•
Linfonodo	•	•	•
Baço	•	•	NA
Adrenal	•	NA	NA
Junção cost.	•	•	NA
Testículo	•	-	NA
Epidídimo	•	-	NA
Pulmão	•	•	NA
Rúmen	NA	•	NA
Olho	•	•	NA

NA – não analisado



### 3.3 – Patologia microscópica

O material coletado de cada animal, após a fixação, foi processado pelas técnicas de rotina histológica que incluem desidratação em álcool etílico de concentrações crescentes, iniciando em 70% e terminando em álcool absoluto; clareamento em xilol, impregnação com parafina histológica fundida a 60°C em processador histotécnico automático, e inclusão em molde metálico retangular com parafina histológica fundida juntamente com concentração de 1% de cera de abelha. Foram obtidos cortes de 5 micrômetros de espessura, em micrótomo manual, dos tecidos emblocados em parafina. Os cortes histológicos foram corados pela técnica da hematoxilina e eosina (HE) (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 1999).

Após a análise das lâminas em microscópio óptico seções do encéfalo, medula espinhal, musculatura cardíaca e esquelética, tireóide, rim e intestino foram coradas pela coloração de PAS, após foi realizado tratamento prévio à coloração de PAS com diastase (PROPHET et al., 1992) em alguns dos cortes citados. As lesões foram avaliadas quanto à sua natureza, intensidade e distribuição. Foi adotada uma graduação quanto à intensidade de ausente (-), leve (+), moderada (++) e acentuada (+++).

Foram processados novos cortes histológicos do material fixado em formol e realizadas colorações pelas técnicas de HE e PAS. Os olhos, previamente fixados em formol foram desidratados em soluções crescentes de etanol (50%-70%-96%), seccionados longitudinalmente a partir do nervo óptico em direção à córnea e examinados macroscopicamente antes de serem processados para histologia. Para estudo topográfico das lesões no SNC foram realizadas cinco seções caudais transversais dos animais identificados como N-617/01 e N-439/02. O SNC após a fixação foi clivado em seções transversais selecionando-se as seguintes regiões: 1 – bulbo na altura do óbex, 2 – cerebelo na altura do pedúnculo cerebelar médio, 3 – mesencéfalo na altura do colículo rostral, 4 – córtex frontal sobre o tálamo e corpo mamilar, 5 – córtex frontal sobre o corpo estriado e quiasma óptico. No animal AP-578/01 foram analisadas regiões do córtex, tronco encefálico e cerebelo. Foram obtidos cortes aleatórios da medula espinhal dos três animais. Foram seccionados e processados juntamente com este material cérebro de dois bovinos controle, de aproximadamente 12 meses de idade, para verificar o padrão de marcação da coloração de PAS.

### **3.4 - Microscopia Eletrônica de Transmissão**

Fragmentos de musculatura esquelética, SNC e fígado foram coletados em glutaraldeído 2%, no momento da necropsia do animal identificado como N-432/02 para processamento da técnica de microscopia eletrônica.

O material coletado, depois de fixado em solução de glutaraldeído a 2% tamponado em cacodilato de sódio, foi refixado em tetróxido de ósmio a 1% e desidratado em soluções crescentes de etanol e incluído em Epon. Os cortes semi-finos foram corados pelo azul de metileno e os ultrafinos contrastados com acetato de uranila e citrato de chumbo e examinados em microscópio eletrônico de transmissão.

### **3.5 - Histoquímica de Lectinas**

Blocos de parafina contendo cerebelo, musculatura esquelética e pele, dos três animais necropsiados foram utilizados para a realização de histoquímica de lectinas, na Universidade Nacional de La Plata.

Foram preparados cortes de cinco micrômetros de espessura de material embocado em parafina proveniente do cerebelo, musculatura esquelética e pele. Após desparafinados, os cortes eram tratados com 0,3% de peróxido de hidrogênio no metanol durante 30 minutos à temperatura ambiente (para inibição da peroxidase endógena), lavados diversas vezes em PBS 0.01M (pH 7.2) e tratados com 0,1% de albumina de soro bovino em PBS por 15 minutos. Os cortes eram incubados durante 1 hora em temperatura ambiente em lectinas biotiniladas. Dez lectinas, com diferentes especificidades foram utilizadas (Tabela 3). A concentração ótima para cada lectina, que permitiu máxima coloração com mínimo de reações inespecíficas, foi a diluição de 30 µg/ml em PBS, exceto para PNA, na qual foi aplicada a concentração de 10 µg/ml. Os cortes foram incubados com complexo avidina biotina peroxidase (ABC) (Vector Laboratories Inc., Burlingame, Ca, USA) durante 45 minutos. A peroxidase foi ativada pela incubação durante 1-2 minutos com kit comercial de diaminobenzidina (Liquid DAB+ Substrate-Chromogen System, Dako, Carpinteria, USA). As amostras foram lavadas em água destilada, desidratadas em concentrações crescentes de etanol, clarificados em xilol e

montados com bálsamo sintético. O controle para coloração de lectinas incluiu: exposição a peroxidase e substrato médio sem lectina e bloqueio, com incubação dos cortes com seus bloqueadores de açúcar (0,1 a 0,2M em PBS) durante 1 hora à temperatura ambiente antes da aplicação.

**Tabela 3** - Lectinas utilizadas para diagnóstico de Glicogenose generalizada tipo II em gado Brahman.

Lectina	Abreviação	Especificidade Carbohidrato
Concanavalia ensiformis	Con A	$\alpha$ -D-Man; $\alpha$ -D-Glc
Glycine max	SBA	$\alpha$ -D-GalNAc; $\beta$ -D-GalNAc; $\alpha$ e $\beta$ -Gal
Arachis hypogaea	PNA	B-D-Gal(1-3) GalNAc
Ricinus communis-I	RCA-1	B-D-Gal > $\alpha$ -D-Gal
Triticum vulgare	WGA	B-D-GlcNAc, NeuNAc
Lens culinaris	LCA	fucosylated core region de bi- ou triantennary
Succinyl-WGA	sWGA	( $\beta$ -(1-4)-D- GlcNAc)
Ulex europaeus-I	UEA-1	$\alpha$ -L-Fuc
Griffonia (Bandeiraea) simplicifolia I	GS-1	$\alpha$ -D-galactose
Griffonia (Bandeiraea) simplicifolia II	GS-2	$\alpha$ , $\beta$ -ligação N-acetilglucosamina e glicogênio

### 3.6 - Reação em Cadeia de Polimerase (PCR)

Para a identificação dos genes responsáveis pela glicogenose generalizada tipo 2 em bovinos da raça Brahman, foram obtidos cortes de 20 micras em micrótomo manual, de amostras do SNC, emblocadas em parafina, pré fixadas em formol à 10%. A técnica de PCR foi processada no departamento de Biotecnologia da UFRGS.

Amostras de sangue de duas bezerras, filhas do touro pai dos bezerros doentes, e de três vacas que pariram bezerros doentes, foram coletadas em tubo vacutainer de 7ml com heparina sódica como anticoagulante e conservadas sob refrigeração, com a finalidade de identificar a presença de animais heterozigotos recessivos (Tabela 4).

**Tabela 4** - Identificação dos animais que foi coletado sangue para detecção de heterozigotos.

Identificação do animal	Parentesco com os animais envolvidos com os casos da doença no rebanho
1	Filha do touro
2	Mãe de um bezerro doente
3	Mãe de um bezerro doente

---

4	Filha do touro
5	Mãe de dois bezerros doentes

---

### 3.6.1 - Extração de DNA de tecido em parafina

Para a extração do DNA de tecido em parafina foram realizados dois cortes de 20µm nos blocos de amostras de SNC dos três animais necropsiados. Os cortes foram acondicionados em um tubo de 2ml e foi adicionada uma solução de lise (1% SDS/ 0,1 NaOH) por 20 minutos à 120 °C e 5 minutos à temperatura ambiente. O material foi centrifugado e adicionado 500µl de PCI, agitado e centrifugado à 12Krpm durante 10 minutos. O sobrenadante foi coletado e adicionado 1 volume de clorofórmio. Repetidos os passos de agitação e centrifugação por 5 minutos. O sobrenadante desta solução foi coletado e adicionado 0,1 volume de AcNa 3M e 1 volume de isopropanol à -20.°C durante 12 horas. Centrifugado à 12Krpm por 10 minutos e lavados em EtOH 70%. A solução foi dissolvida em 50µL de água (COOMBS et al., 1999; SHI et al., 2002).

### 3.6.2 - Extração de DNA genômico de sangue

O sangue foi coletado em tubos a vácuo de 7 ml com heparina de sódio como anticoagulante (BD Vacutainer®). Dois mililitros foram transferidos para um tubo de polipropileno de 15 mL com 10 mL de tampão de lise de hemácia (TL1), misturados por inversão e centrifugados a 2000g por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e o pellet suspenso com 10 mL de TL1, e repetidos os passos de mistura e centrifugação. Quatrocentos microlitros de tampão lise de células brancas (TL2) foram adicionados ao pellet e misturados com a pipeta. Cento e cinquenta microlitros de NaCL (6M) foram adicionados e misturados no vortex e mantidos em gelo por 10 minutos. A mistura foi centrifugada a 14000g por 5 minutos e o sobrenadante foi coletado em um novo tubo com 1mL de etanol 100%. O tubo foi agitado e centrifugado a 8000g por 10 minutos. O pellet foi lavado duas vezes com etanol 70% e secado a 37 por 5 minutos. O DNA foi suspenso em 200 microlitros de água miliQ autoclavada (MILLER et al., 1988)

### 3.6.3 - Genotipificação por PCR

A reação de PCR foi realizada em 25µL utilizando 20ng de DNA genômico, 2,5 µL de tampão 10x, 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 1mM de dNTPs, 20 picomol de primer sense e antisense para os sítios 1057, 1351 e 1783 (DENNIS et al., 2002), 2 unidades de Taq polimerase e água miliQ autoclavada para completar 25 µL. A reação foi amplificada em

termocicladores por 35 ciclos: 94°C por 30 segundos, 56.°C por 15 segundos e 72 C por 15 minutos. O produto de amplificação foi checado em gel de agarose 2%. Dez microlitros da amplificação do PCR foram submetidos à restrição com as respectivas enzimas, BglI para os sítios 1057 e 1351 e Bsi EI para o sítio 1783 (2U/tubo) durante 12 horas. A restrição foi analisada em gel de poliacrilamida 10% corado com brometo de etídio (SAMBROOK & RUSSELL, 2001).

## 4 - RESULTADOS

### 4.1 - Epidemiologia

A propriedade onde ocorreu o nascimento dos animais doentes situa-se em Porto Lucena, Rio Grande do Sul. O rebanho é composto por um touro da raça Brahman e 20 vacas cruza Brahman, criados de forma extensiva em pasto nativo. Na tabela 5 é apresentado o total de animais nascidos na propriedade e o número de animais com sinais clínicos nos três anos de ocorrência da enfermidade. No ano de 2002 o touro foi descartado do rebanho e um touro da raça Nelore foi utilizado para reprodução. No ano de 2003, após a introdução do novo touro, não foi observado o nascimento de animais doentes.

Os sinais clínicos iniciavam nos animais ao redor de 1 mês de idade e progrediam com a idade. Eram administrados antibióticos, anti-helmínticos e fluidoterapia aos animais doentes, sem melhora clínica. Foi realizada eutanásia nestes animais devido a incapacidade de se alimentarem ou beber água sem auxílio. O animal identificado como N-617/01 era macho de 1 ano de idade, o N-439/02 fêmea de 6 meses e o AP-578/01 macho de 9 meses de idade.

Em visita realizada a propriedade não foram encontradas plantas tóxicas que pudessem causar sintomatologia clínica e lesões histopatológicas semelhantes às encontradas.

**Tabela 5** – Total de animais nascidos e total de animais afetados no período de ocorrência da enfermidade.

<b>Ano</b>	<b>Total de Nascimento</b>	<b>Animais afetados</b>	<b>%</b>
<b>2000</b>	16	3	18,75
<b>2001</b>	19	5	26,3
<b>2002</b>	12	2	16,6
<b>Total</b>	47	10	<b>21</b>

### 4.2 - Sinais Clínicos

Os animais apresentavam fraqueza (Figura 2), tremores musculares, letargia, apatia (Figura 3), dificuldade em acompanhar a mãe, quedas constantes com impossibilidade para voltar a permanecer em estação (Figura 4) e retardo no crescimento quando comparados com os demais animais da mesma idade que estavam na propriedade e recebiam as mesmas condições de manejo (Figura 5).



**Figura 2** – Bovino cruza Brahman, com diagnóstico de glicogenose generalizada apresentando fraqueza muscular.



**Figura 3** - Bovino cruza Brahman, com diagnóstico de glicogenose generalizada apresentando apatia.





**Figura 4** - Bovino cruza Brahman, com diagnóstico de glicogenose generalizada apresentando dificuldade para levantar após queda.



**Figura 5** – Bovino cruza Brahman com diagnóstico de glicogenose generalizada (primeiro plano) e bovinos normais com a mesma idade.

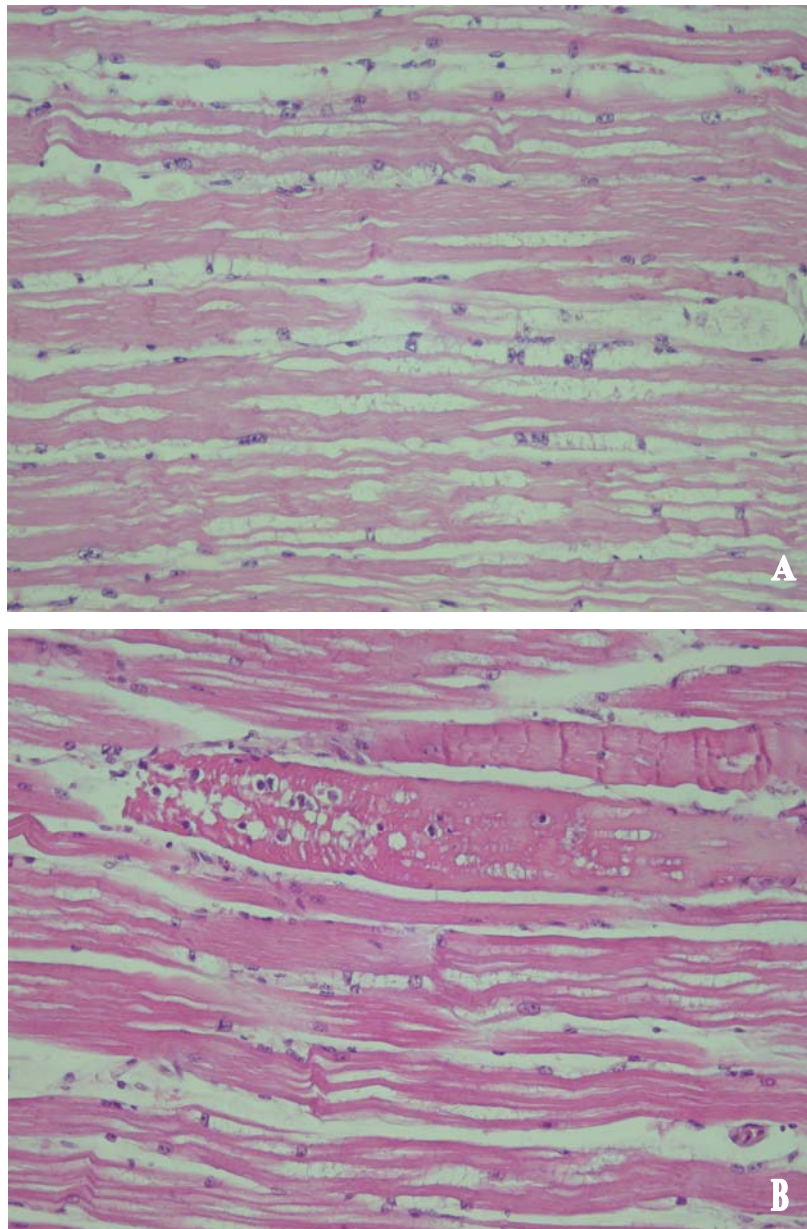
### **4.3 - Achados de Necropsia**

Palidez da musculatura dos membros e tronco foi a única alteração macroscópica encontrada nos três animais necropsiados.

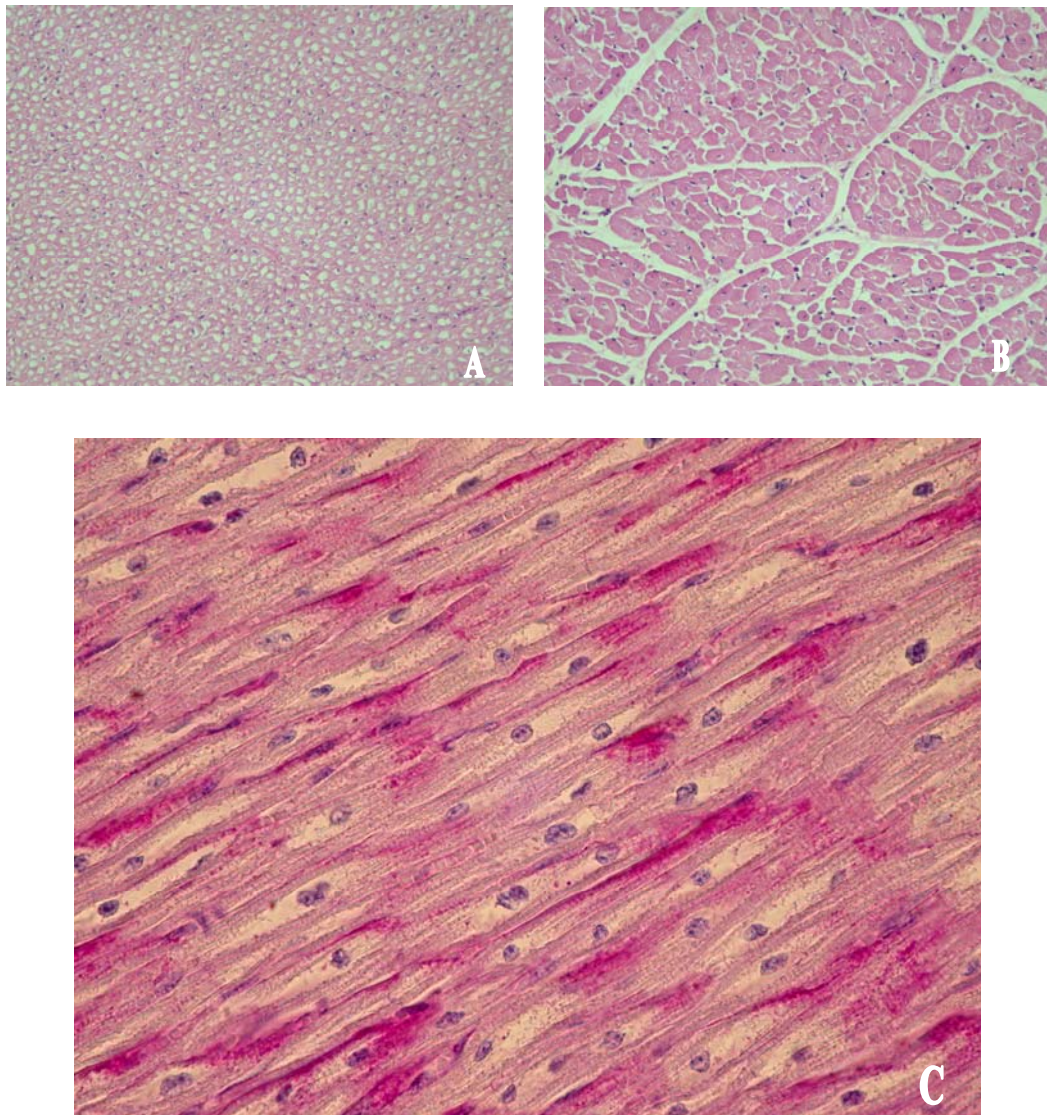


#### 4.4 - Lesões Histológicas

Vacuolização e distensão citoplasmática celular em diversos tecidos (Tabela 6) foi a principal alteração histológica encontrada. Estas alterações foram mais acentuadas e evidentes na musculatura esquelética (Figura 6), miocárdio (Figura 7) e fibras de Purkinje do coração (Figura 8). Nas fibras musculares esqueléticas observaram-se áreas multifocais de necrose moderada associada a infiltrado histiocítico moderado.

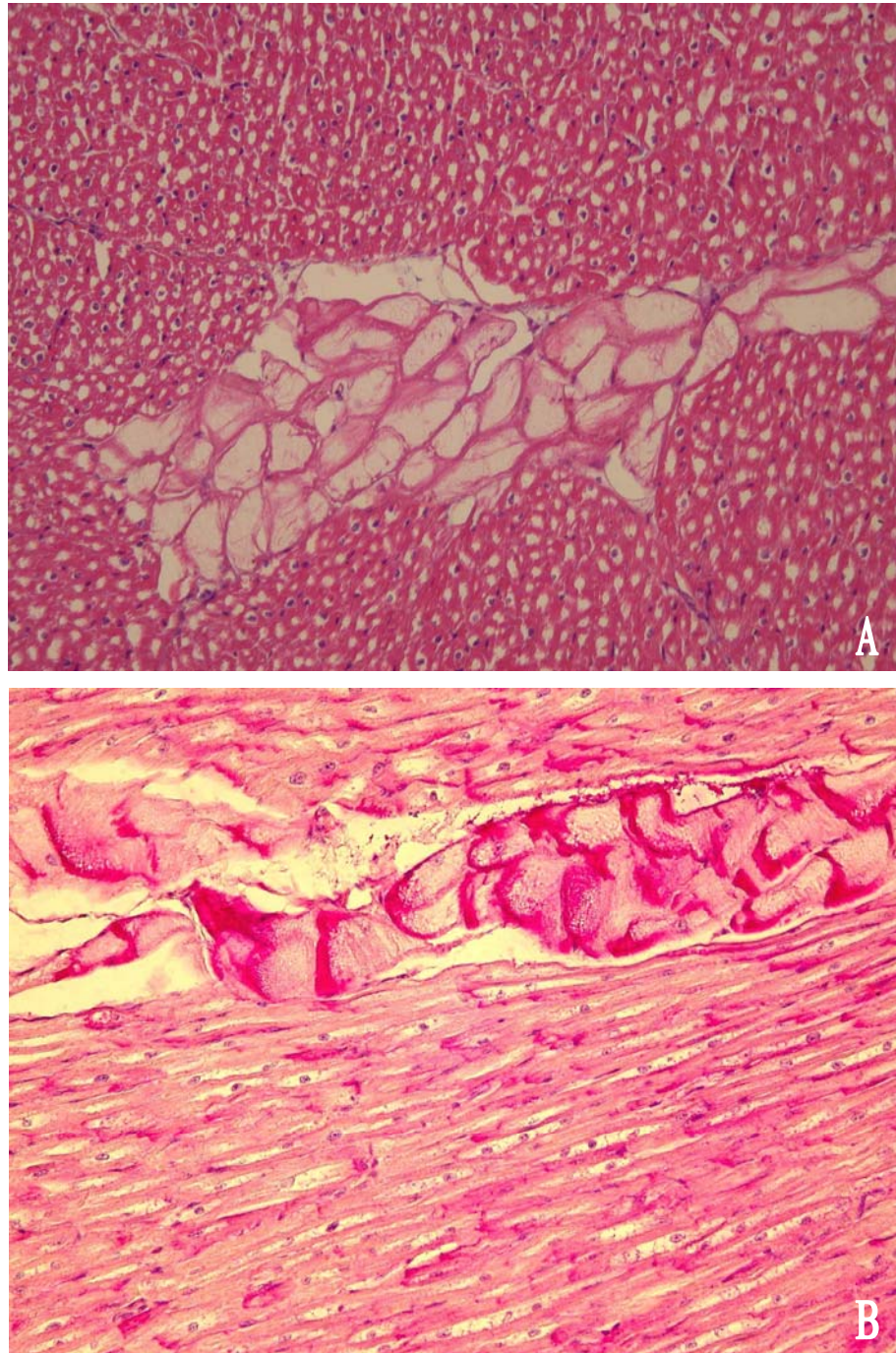


**Figura 6** – Bovino Brahman com glicogenose hereditária. Musculatura esquelética. A. Vacuolização acentuada da musculatura esquelética (Obj. 40, HE). B. Necrose de fibra muscular associada á infiltrado mononuclear (Obj. 40, HE).



**Figura 7** – Bovino Brahman com glicogenose tipo II. Musculatura cardíaca. A. Vacuolização acentuada na musculatura cardíaca (Obj. 20, HE). B. Musculatura cardíaca de um bovino controle (Obj. 20, HE). C. Grânulos PAS positivos na musculatura cardíaca (Obj. 40, PAS).

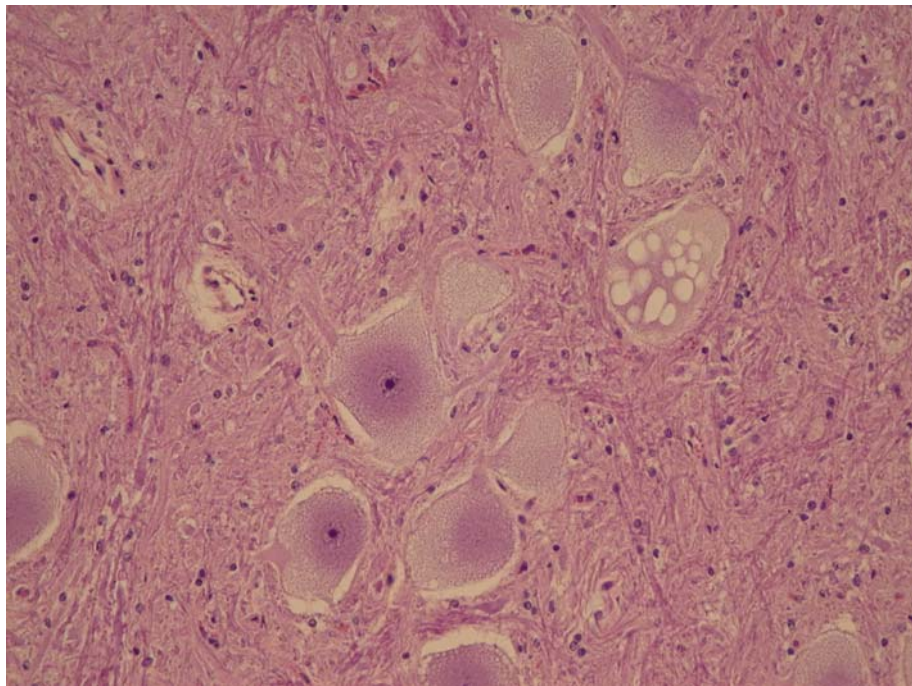




**Figura 8** – Bovino Brahman com glicogenose tipo II. Musculatura cardíaca. A. Vacuolização acentuada das fibras de Purkinje e musculatura cardíaca (Obj. 20, HE). B. Grânulos PAS positivos nas fibras de Purkinje e musculatura cardíaca (Obj. 20, PAS).

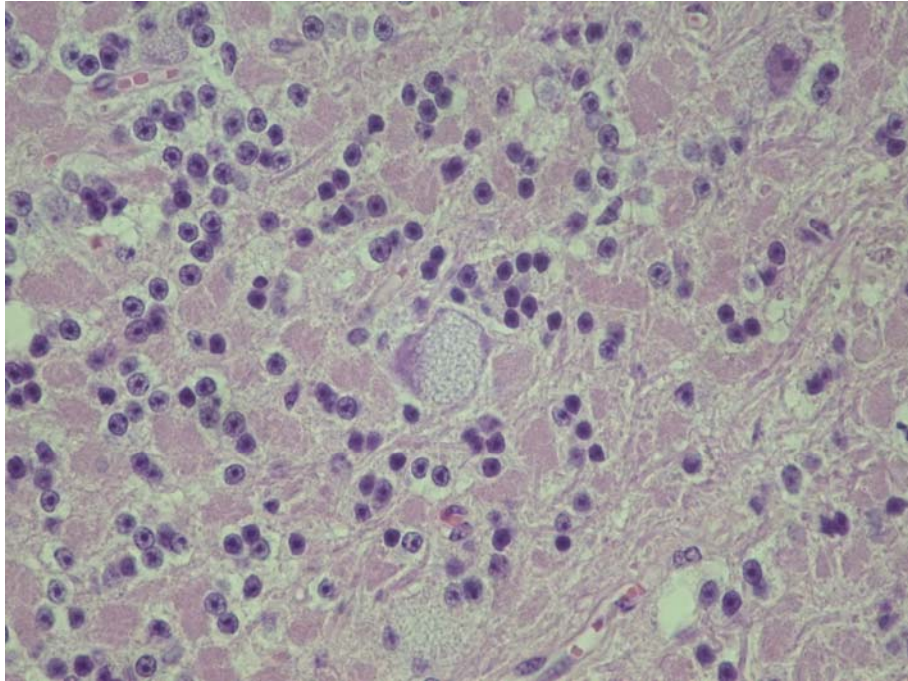
No SNC vacuolização do citoplasma neuronal foi a principal lesão histológica encontrada, sendo mais severa na região do óbex (Figura 9), substância branca e camada granular do cerebelo, mesencéfalo e medula espinhal (Tabela 7). Apesar da presença de vacúolos grandes e únicos, no SNC predominou vacuolização finamente granular dos

neurônios. Na região cerebelar neurônios de Golgi da camada granular, mostraram-se mais intensamente vacuolizados (Figura 10), enquanto que em neurônios de Purkinje foi observada leve vacuolização. Na medula espinhal foi observada vacuolização acentuada em neurônios das raízes dorsal e ventral, sem diferenças significativas nestas áreas. Foi observada também, vacuolização em neurônios dos plexos mioentérico (Figura 11) e submucoso e do gânglio trigêmio (Figura 12).

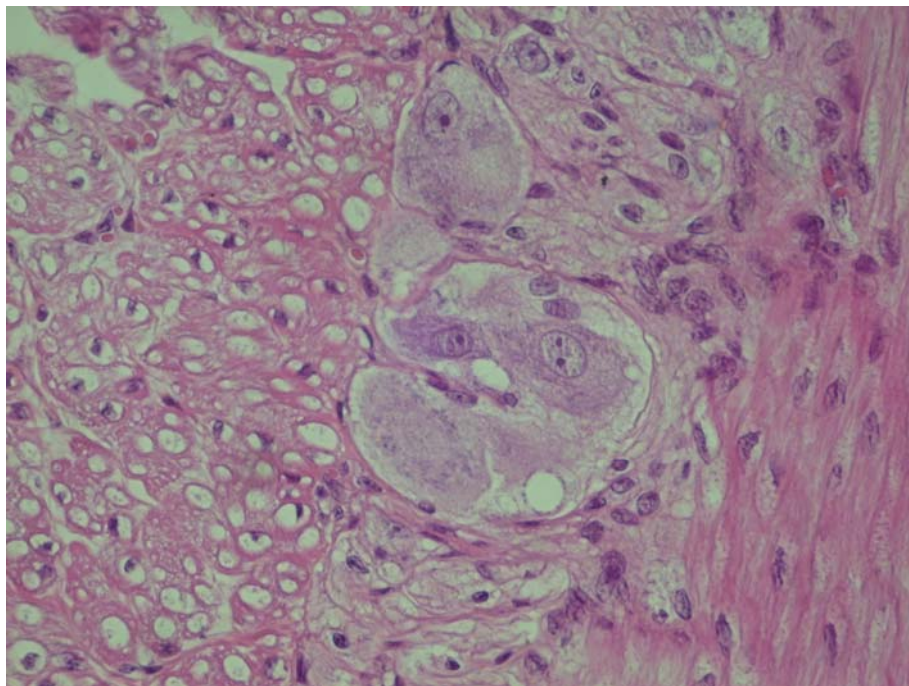


**Figura 9** – Bovino Brahman com glicogenose tipo II, seção 1, óbex: vacuolização e distensão do citoplasma neuronal (Obj. 20, HE).

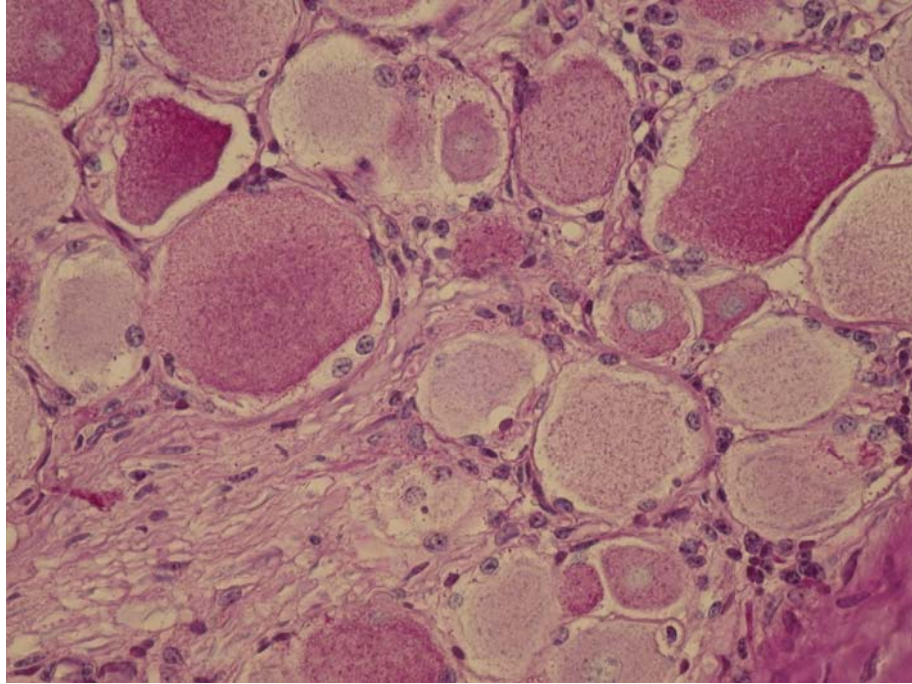




**Figura 10** – Bovino Brahman com glicogenose tipo II seção 2, cerebelo: vacuolização acentuada em neurônio de Golgi da camada de células granulares (Obj. 40, HE).

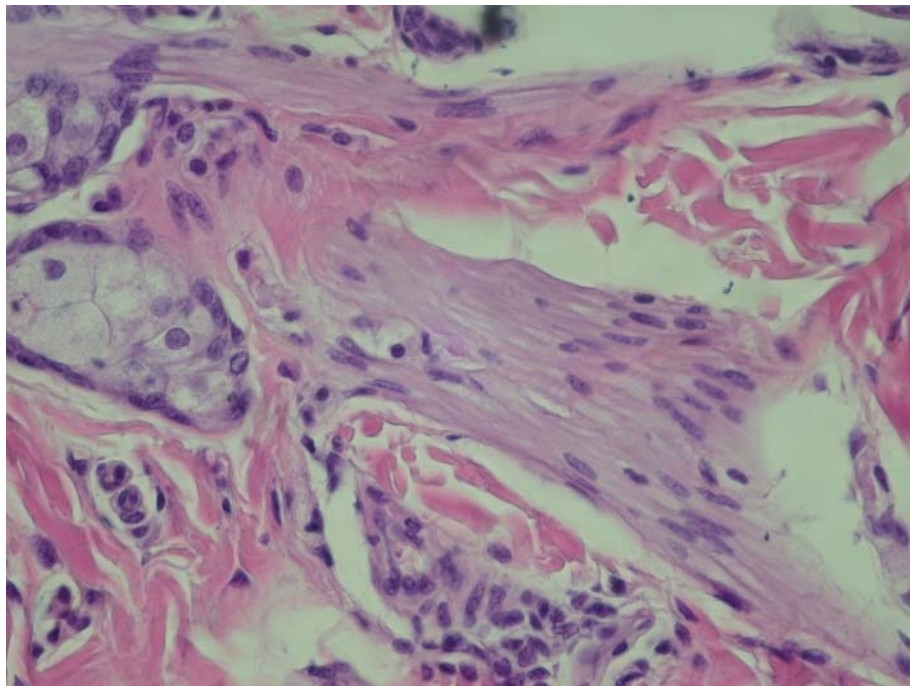


**Figura 11** – Bovino Brahman com glicogenose tipo II. Intestino: vacuolização e distensão citoplasmática de neurônios do plexo mioentérico e musculatura lisa (Obj. 40, HE).



**Figura 12** – Bovino Brahman com glicogenose tipo II. Gânglio trigêmio: grânulos PAS positivos em neurônios vacuolizados. (Obj. 40, PAS)

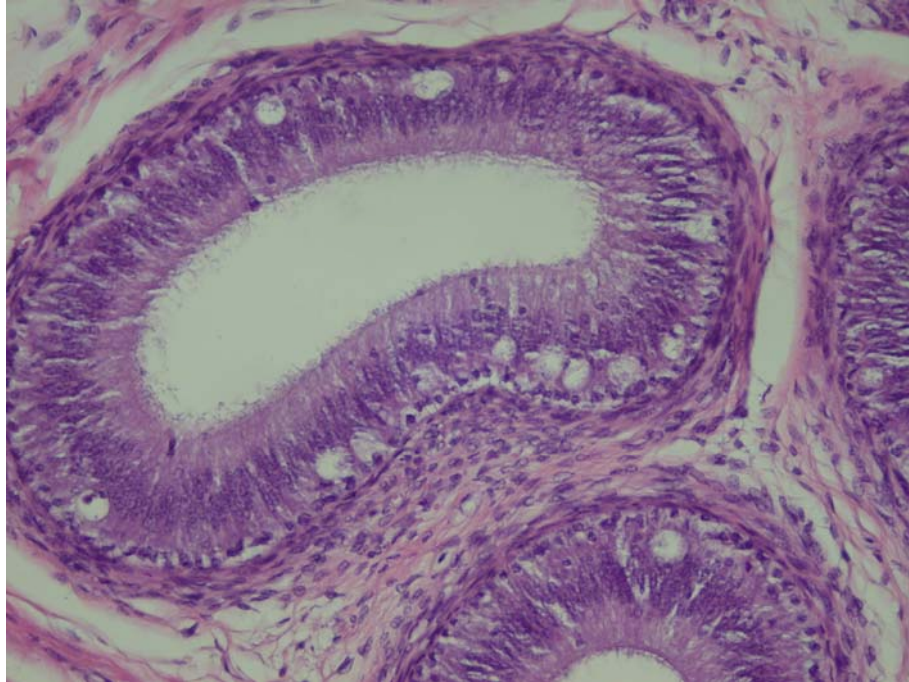
Na pele foi encontrada vacuolização intensa dos músculos pilo-erectores (Figura 13) e na túnica muscular de vasos.



**Figura 13** – Bovino Brahman com glicogenose tipo II. Pele: vacuolização dos músculos piloerectores (Obj. 40, HE).



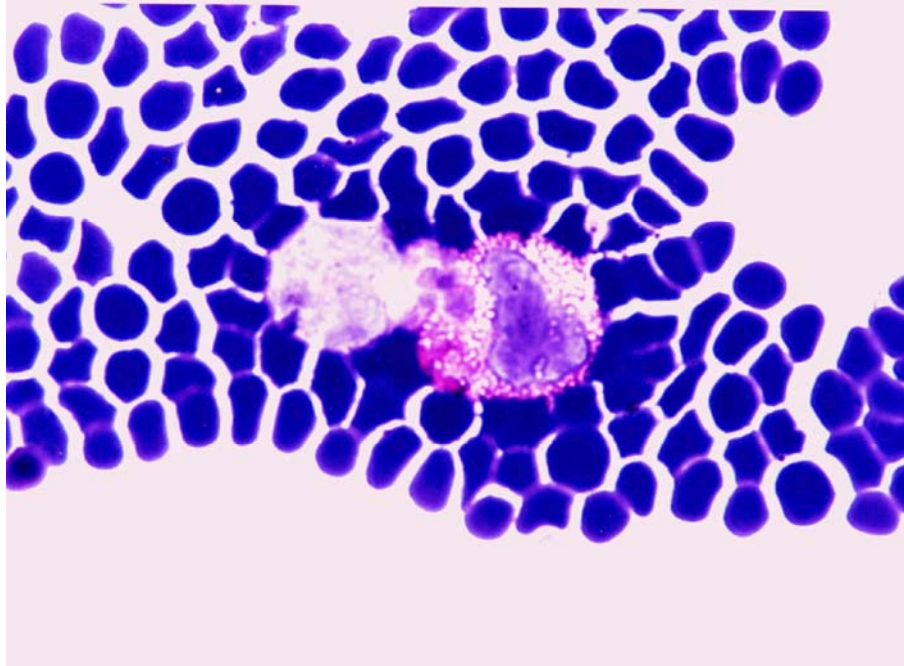
Também foram observados vacúolos no epitélio glandular da tireóide, epitélio tubular renal, musculatura lisa dos intestinos e do rúmen, células ganglionares da retina e em hepatócitos. Na análise histológica do epidídimo do animal N-617/01 verificou-se vacuolização das células epiteliais, estas foram mais intensas na região do corpo do epidídimo (Figura 14).



**Figura 14** – Bovino Brahman com glicogenose tipo II. Epidídimo: vacuolização das células epiteliais (Obj. 40, HE).

No esfregaço de sangue dos animais necropsiados observou-se vacuolização em monócitos (Figura 15).

Nos encéfalos dos animais controle foi observado presença de glicogênio em algumas das regiões analisadas através da marcação de PAS positiva (Tabela 8).



**Figura 15** - Esfregaço sanguíneo de bovino Brahman afetado com glicogenose tipo II. Vacuolização em célula mononuclear.

**Tabela 6** - Intensidade das lesões nos tecidos analisados.

	N-617/01	N-439/02	AP-578/01
Musc. Cardíaca	+++	+++	+++
Musc. Esquelética	+++	+++	+++
Diafragma	+++	+++	+++
Língua	+++	+++	+++
Tireóide	++	++	+++
Intestino (muscular)	+++	+++	NA
Trigêmio	++	++	+++
Fígado	++	++	+++
Rim	+++	++	++
Pele (vasos, músculo. pilo erector)	+++	+++	+++
Linfonodo	NA	S/A	NA
Baço	S/A	S/A	NA
Adrenal	S/A	NA	NA
Junção costochondral.	S/A	S/A	NA
Testículo	+	NA	NA
Epidídimo	+++	NA	NA
Pulmão (vasos)	+++	+++	+++
Rúmen (muscular)	NA	+	NA
Olho	++	++	NA

NA – não analisado

S/A – ausência de alterações



**Tabela 7** - Distribuição e intensidade de vacuolização nas regiões de encéfalo analisadas.

Identificação das áreas	N-617/01	N-439/02
<b>1</b>	+++	+++
<b>2</b>	+++	+++
<b>3</b>	+++	+++
<b>4</b>	++	++
<b>5</b>	+	+

(-) ausente, (+) leve, (++) moderada, (+++) acentuada.

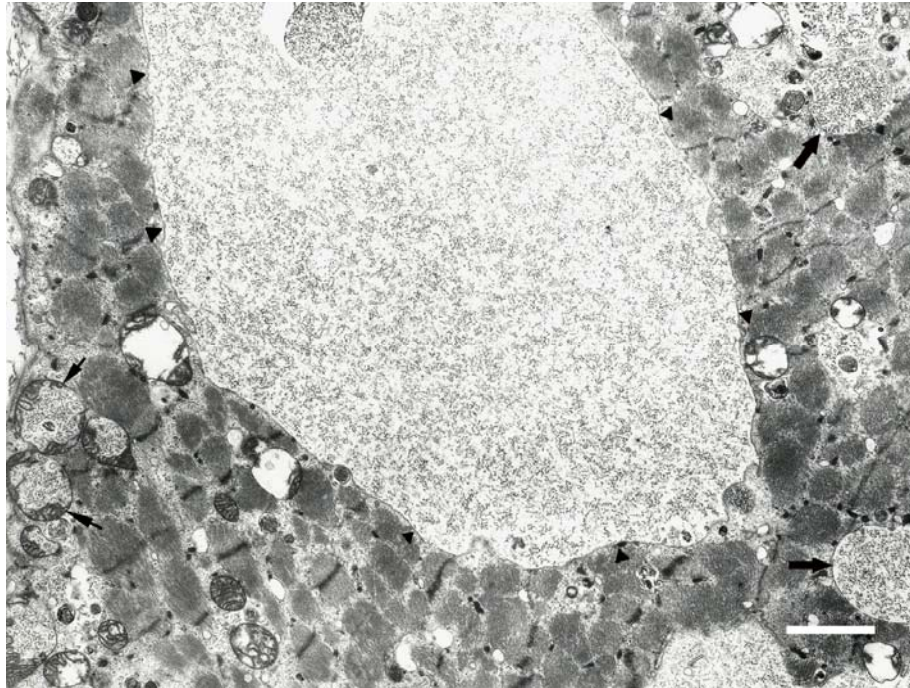
**Tabela 8** - Distribuição e intensidade da coloração de PAS nos encéfalos controle.

Identificação das áreas	Controle 1	Controle 2
<b>1</b>	+++	+++
<b>2</b>	++	++
<b>3</b>	+	+
<b>4</b>	+	+
<b>5</b>	+	-

(-) ausente, (+) leve, (++) moderada, (+++) acentuada.

#### 4.5 - Microscopia Eletrônica

O material armazenado foi encontrado livre no citoplasma e envolto por membrana nos tecidos analisados e também em algumas mitocôndrias da musculatura esquelética. O acúmulo de glicogênio foi mais acentuado na musculatura esquelética (Figura 16), fígado e neurônios do sistema nervoso central. Neurônios de Purkinje do cerebelo mostraram presença discreta deste material envolto por membrana.



**Figura 16** - Musculatura esquelética de bovino Brahman com glicogenose tipo II. Acúmulo de glicogênio no sarcoplasma delimitado por membrana (cabeça de seta) e em glicogenolisossomos (setas grandes). Mitocôndrias distendidas, com partículas de glicogênio na matriz (setas pequenas) (ME, 10.500 x).

#### 4.6 - Histoquímica de Lectinas

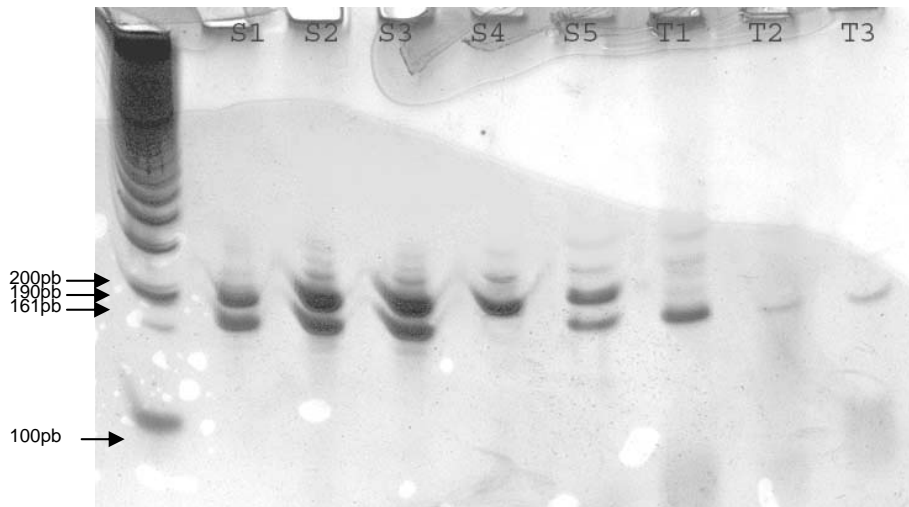
Em cortes da pele, os vacúolos reagiram fortemente com *Griffonia simplicifolia* (GS-II) nos músculos pilo-erectores, musculatura lisa dos vasos sanguíneos (Figura 17) e glândulas. *Concanavalia ensiformes* (Con-A) corou os mesmos elementos citados, porém com menor intensidade. As duas lectinas citadas marcaram o material armazenado na musculatura esquelética e tecido nervoso. Foram corados neurônios no cerebelo e medula espinhal. O material armazenado não foi corado com alguma das outras oito lectinas testadas. Todos os controles foram negativos.



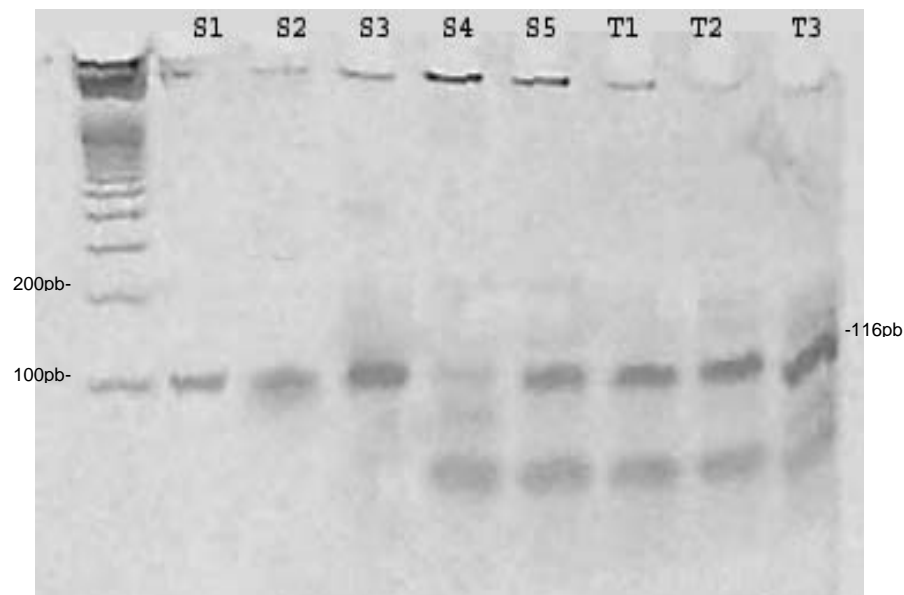
**Figura 17** – Bovino Brahman com glicogenose tipo II, musculatura lisa de vaso: histoquímica das lectinas, forte marcação com GS-II (Obj. 40).

#### **4.7 - Reação de polimerase em cadeia**

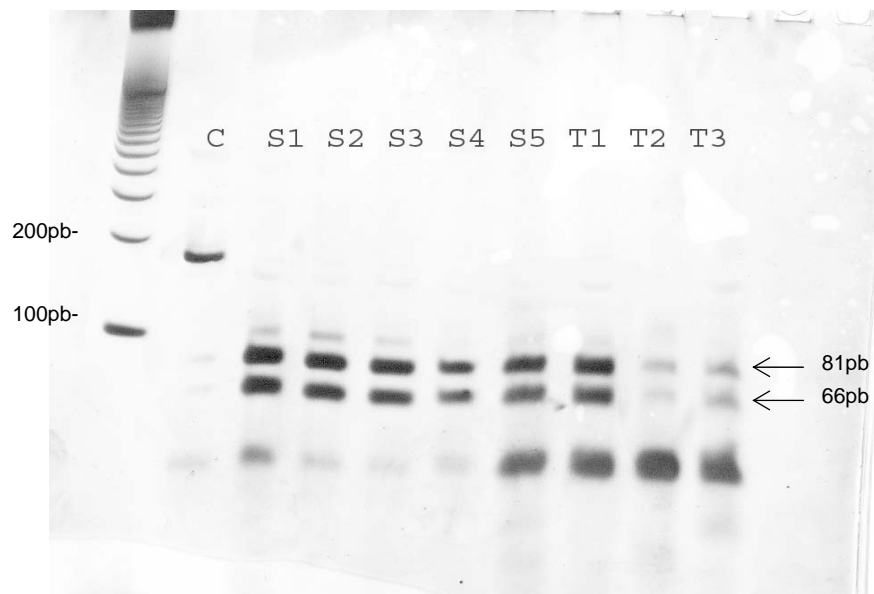
Os três animais analisados, com lesões características de glicogenose generalizada na microscopia óptica, foram positivos para a mutação 1057 $\Delta$ TA no gene da alfa glicosidase, clivados pela enzima de restrição Bgl I, apresentando um padrão de homozigose. Foi detectada heterozigose para mutação 1057 $\Delta$ TA na análise do sangue dos animais 1, 2, 3 e 5 (Figura 18). O animal 4 é homozigoto selvagem do alelo 1057. Todos os animais testados foram homozigotos para os alelos 1783 e 1351 (Figuras 19 e 20).



**Figura 18-** Genotipificação pela PCR e digestão com Bgl I para 1057 $\Delta$ TA. S1 a S5 sangue de bovinos clinicamente sadios da propriedade afetada e T1 a T3 tecido de animais clinicamente afetados e confirmados através da histopatologia. Os materiais S1,S2, S3 e S5 são heterozigotos, e T1, T2 e T3 são homozigotos recessivos. Somente S4 é homozigoto selvagem.



**Figura 19-** Genotipificação pela PCR e digestão com BsiEI para o alelo 1783T. S1 a S5 sangue de bovinos clinicamente sadios da propriedade afetada e T1 a T3 tecido de animais clinicamente afetados confirmados através da histopatologia. A banda 116pb é discriminatória para o alelo 1783T, logo todos os bovinos analisados são homozigotos



**Figura 20** - Genotipificação pela PCR e digestão com Bgl I para o alelo 1351T. S1 a S5 sangue de bovinos clinicamente saudáveis da propriedade afetada e T1 a T3 tecido de animais clinicamente afetados e confirmados através da histopatologia. C é o produto da PCR sem a enzima de restrição. As bandas 81pb e 66pb são discriminatórias para o alelo 1351C, logo todos os bovinos são homocigotos.

## 5 – DISCUSSÃO

Os achados clínicos, histológicos e ultra-estruturais observados nesses bezerros Brahman são consistentes com relatos anteriores de glicogenose generalizada tipo II em bovinos da raça Brahman na Austrália (O'SULLIVAN et al., 1981; REICHMANN et al., 1993). O diagnóstico de glicogenose generalizada foi confirmado pela presença da mutação letal 1057 $\Delta$ TA no gene da alfa glicosidase ácida nos tecidos dos bezerros doentes. Esta mutação ocorre somente em bovinos da raça Brahman e é a mais comum relacionada com glicogenose generalizada nesta raça (DENNIS et al., 2002). A microscopia eletrônica de transmissão e a histoquímica de lectinas foram métodos complementares auxiliares, também utilizados para comprovar a intensidade da presença de glicogênio acumulado em grande quantidade nos tecidos analisados.

Algumas características presentes em doenças do acúmulo lisossomal foram encontradas no rebanho afetado, e contribuíram para o diagnóstico presuntivo da doença. Entre elas o caráter hereditário autossômico recessivo, com o nascimento de bezerros doentes do cruzamento de pais heterozigotos clinicamente normais e a ocorrência em uma raça específica, na qual uma doença do acúmulo lisossomal foi relatada (SUMMERS et al., 1995).

A introdução de um novo touro da raça Nelore para cobertura das vacas Brahman sugere que o touro Brahman que estava sendo utilizado para reprodução é heterozigoto para a mutação 1057 $\Delta$ TA, já que não foram relatados casos da doença com a utilização do novo touro. As vacas eram as mesmas que tinham parido bezerros doentes, mas o cruzamento com um touro não portador do gene não permitiu a ocorrência de homozigose e o nascimento de animais doentes. A mutação 1057 $\Delta$ TA no gene da alfa glicosidase ácida encontrada nos filhos deste touro reforçam a possibilidade deste animal ser heterozigoto para a mutação em questão. Os alelos 1783C e 1351C em homozigose reforçam o envolvimento da mutação 1057 $\Delta$ TA nos casos analisados. A amostra identificada como S4, proveniente de uma filha do touro Brahman apresentou o alelo 1057 selvagem, indicando que esta vaca não é portadora de gens causadores de glicogenose generalizada, podendo ser utilizada para reprodução sem haver transmissão dos gens da doença para a progênie.

A apresentação clínica da doença em animais com menos de 1 ano de idade, apresentando fraqueza muscular sugere uma comparação com a forma juvenil da doença observada em humanos, na qual os sinais clínicos são de doença muscular generalizada

e progressiva, iniciando com dificuldade em andar (EDWARDS & RICHARDS, 1979). As mutações que causam glicogenose generalizada em bovinos, e que têm sido identificadas nas raças Brahman e Shorthorn resultam em terminação prematura de translação no gene da enzima alfa glicosidase ácida. Em humanos, as mutações que causam terminação prematura da translação no gene da alfa glicosidase resultam na forma infantil severa da doença (DENNIS et al., 2000).

Os níveis da atividade da alfa glicosidase ácida no músculo de bovinos afetados varia em torno de 9% (DENNIS et al., 2002). A alta atividade da enzima no músculo pode contribuir para o fenótipo menos severo, como observado ocasionalmente em pacientes humanos.

Casos da forma de desenvolvimento adulto não foram relatados em bovinos, e esta forma da doença se apresenta como uma síndrome distinta clínica e morfológicamente na qual as alterações são vistas somente na musculatura esquelética não sendo encontradas na musculatura cardíaca e SNC, apesar da atividade da alfa glicosidase ácida estar diminuída nestes tecidos (COOK et al., 1982). As características do sistema extensivo de produção animal podem colaborar contra a probabilidade de casos de desenvolvimento adulto da doença serem diagnosticado em bovinos (DENNIS et al., 2000). Reichmann et al, em 1993 observaram que a progressão da doença e a expectativa de vida são influenciadas pela idade ao desmame e condições extensivas de criação. Com o sistema extensivo de criação o diagnóstico de glicogenose também fica comprometido, pois os animais doentes podem morrer de causas acidentais, facilitadas pela fraqueza muscular, antes que esta doença seja diagnosticada. Além disso, a raça Brahman é utilizada com a finalidade de corte, portanto, animais que viessem a desenvolver a forma adulta da doença, provavelmente seriam abatidos antes do desenvolvimento dos sinais clínicos.

O principal sinal clínico da doença, caracterizado por fraqueza muscular está relacionado com os achados microscópicos de vacuolização acentuada na musculatura esquelética com presença de material PAS positivo. A progressão desse sinal clínico é devida a evolução do dano muscular, que parece aumentar com a idade. No entanto, estudos realizados por McC Howell (1984), revelaram que o acúmulo de glicogênio na musculatura esquelética não é progressivo, alcançando níveis elevados no começo da vida do animal. O dano da fibra muscular é progressivo e é esse dano progressivo responsável pela fraqueza muscular, falha cardíaca e respiratória terminal (McC HOWELL et al., 1984). Acredita-se que o conteúdo lisossomal, incluindo enzimas

hidrolíticas seja continuamente liberado no sarcoplasma e produza a anormalidade morfológica progressiva descrita nos animais doentes. Tal evento é sugerido pelo constante e elevado conteúdo de glicogênio no músculo afetado. Este glicogênio não pode ser degradado no lisossomo devido à falta de atividade hidrolítica disponível. O glicogênio deve ser liberado e hidrolisado no sarcoplasma onde há uma alfa glicosidase neutra. Muitas destas hidrolases possuem significativa atividade em pH neutro e pode-se esperar que tenham efeito degenerativo no músculo (McC HOWELL et al., 1984).

Embora tenham sido encontradas lesões na análise histológica dos olhos dos animais N-617/01 e N-439/02 não foi relatada sintomatologia de cegueira nestes animais. Reichmann (1993) diagnosticou cegueira em dois bezerros Brahman que apresentavam glicogenose generalizada, no entanto, as lesões encontradas nos olhos de um destes animais foram semelhantes às encontradas em outros dois animais doentes que não apresentavam cegueira. Estas lesões consistiam em vacuolização moderada das células ganglionares da retina e de células da glia no nervo óptico. Neste estudo, segundo o autor, a cegueira não foi diretamente relacionada com glicogenose generalizada.

A análise do SNC dos animais estudados não demonstrou diferenças significativas na intensidade das lesões. Apesar do dano na musculatura esquelética, causado pelo acúmulo de glicogênio, ser progressivo, aumentando com a idade, este comportamento não tem sido observado nos tecidos nervosos de bovinos com glicogenose generalizada. Cook (1982) avaliou o SNC de dois bezerros de 3 e 7 meses de idade e de um animal que morreu após um ano de idade e as lesões encontradas no tecido nervoso foram semelhantes.

Apesar da intensidade das lesões encontradas no SNC, não foram observados sinais clínicos associados nos bovinos estudados. A vacuolização citoplasmática leve observada nos neurônios de Purkinje, com presença discreta de grânulos de glicogênio cercados por membrana encontradas nos animais doentes foram anteriormente descritas em bovinos da raça Shorthorn (EDWARDS & RICHARDS, 1979). Neste estudo, realizado por Edwards e Richards (1979), ao exame clínico do sistema nervoso, os animais se mostraram alertas, com percepção de dor normal, resposta à ameaça e reflexo pupilar. Não houve evidências de movimentos de cabeça, estrabismo ou nistagmo, indicando que o efeito de glicogenose generalizada na função neurológica é limitado.



A ausência de sinais clínicos neurológicos tem sido atribuída ao pouco envolvimento dos neurônios de Purkinje no córtex cerebelar em bovinos com glicogenose generalizada (EDWARDS & RICHARDS, 1979). Em bovinos com alfa manosidose, outra doença do armazenamento lisossomal de acúmulo de glicoproteína, são observados sinais clínicos neurológicos severos, associados ao comprometimento das células de Purkinje (DORLING et al., 1978). A intensidade da lesão muscular é um outro fator que pode contribuir para mascarar a alteração clínica neurológica que estes animais possam apresentar.

As áreas do córtex cerebral responsáveis pelo comportamento, intelecto e traços de personalidade são o lobo frontal e córtex temporal. Os estados mentais de depressão podem ser decorrentes de alterações nestas áreas juntamente com o sistema límbico. A apatia apresentada pelos animais doentes pode ser uma manifestação neurológica da doença decorrente da lesão no córtex cerebral e áreas correspondentes ao sistema límbico.

A disponibilidade de substrato presente em uma célula determina a quantidade deste substrato acumulado nas células em determinadas doenças de acúmulo lisossomal (JOLLY et al., 1977). Esse é um motivo pelo qual a musculatura esquelética está intensamente afetada na glicogenose generalizada, já que o glicogênio está presente em altas concentrações neste tecido. No SNC o glicogênio está presente, embora em menor quantidade se comparado com o fígado e músculo (NELSON et al. apud BROWN 2004.; KONG et al., 2002), e a sua função como fornecedor de energia está sendo avaliada. Estudos recentes sugerem que o glicogênio pode atuar como meio energético para manter os elementos neurais durante períodos de privação de energia (BROWN, 2003). Acredita-se que o glicogênio seja degradado a um monocarboxilato, provavelmente lactato, que é enviado dos astrócitos para os elementos neurais, onde é metabolizado oxidativamente (DRINGEN et al.; IZUMI et al., apud BROWN 2004). O glicogênio localizado nos astrócitos possui uma regulação dinâmica e exerce um papel importante na ajuda do suprimento energético para os axônios do SNC sob condições fisiológicas e patológicas (BROWN, 2003). No cérebro de mamíferos o glicogênio está localizado predominantemente em astrócitos (BROWN 2004; PHELPS apud KONG 2002). Glicogênio também é encontrado em células neuronais e células da glia. A localização do glicogênio no SNC varia com a idade do animal e ainda entre as regiões do cérebro. Mesmo quando há substrato metabólico adequado para garantir a função do axônio, a quantidade de glicogênio está diminuída. Como axônios e astrócitos podem

metabolizar lactato, sugere-se que o glicogênio seja constantemente metabolizado, mesmo sob condições em que este não é necessário para manter a função (BROWN et al., 2003).

Estruturas da substância cinzenta tendem a possuir maiores concentrações de glicogênio do que estruturas da substância branca (DUFFY et al.; KOIZUMI; SWANSON et al., apud BROWN 2004), no entanto, um único estudo demonstrou aumento da concentração de glicogênio na substância branca em comparação com a substância cinzenta (KONG et al., 2002). As estruturas da substância cinzenta onde foram encontradas as maiores concentrações de glicogênio são em ordem decrescente: ponte/medula, cerebelo, hipocampo, hipotálamo e tálamo, seguidos por mesencéfalo, córtex cerebral e corpo estriado, que possuem a mesma concentração (BROWN, 2004). Nas áreas analisadas dos animais doentes observou-se vacuolização mais intensa nas regiões do óbex, cerebelo, mesencéfalo e medula espinhal.

Apesar das variações que podem haver na distribuição de glicogênio no SNC, a presença deste carboidrato, representada pela coloração PAS positiva pôde ser observada em todas as áreas estudadas dos animais controle. Esta coloração foi específica para glicogênio porque a diastase, enzima que digere o glicogênio reduziu a coloração consideravelmente. A presença de glicogênio nas regiões analisadas e a intensidade das lesões encontradas nos animais doentes, não são facilmente relacionadas já que o glicogênio sofre variações de distribuição no SNC e eventos fisiológicos podem estar associados com a diminuição da quantidade deste carboidrato no cérebro.

Um touro normal, com 1 ano de idade é sexualmente maduro e capaz de produzir espermatozóides viáveis. O animal N-617/01 apresentou lesões de vacuolização nas células epiteliais do epidídimo. Não foi estabelecida a relação das lesões encontradas no epidídimo e a capacidade de produção de espermatozóides viáveis para reprodução. No entanto, mesmo que haja produção de espermatozóides viáveis a capacidade de monta deste animal estaria prejudicada pela fraqueza muscular.

Estudos realizados por Dennis et al, em 2002, revelaram que a apresentação clínica e observações bioquímicas de bezerros cruza Brahman com Shorthorn foram similares àquelas observadas em bezerros Brahman e Shorthorn afetados. Cruzamento entre animais heterozigotos Brahman e Shorthorn resultou em produtos heterozigotos clinicamente afetados. Isto torna a glicogenose uma doença a ser considerada no diagnóstico diferencial quando observado, no desmame, fraqueza e/ou mortalidade em

raças derivadas Brahman e Shorthorn, como Santa Gertrudes, Droughtmaster, Brangus e Braford.

Na Austrália, onde há um dos maiores rebanhos mundiais de bovinos da raça Brahman, a previsão das perdas anuais decorrentes de glicogenose generalizada em bovinos desta raça são estimadas em cerca de U\$1,284,000, o que torna o estudo e controle desta doença de grande importância com o objetivo de evitar perdas econômicas (DENNIS et al., 2002). Atualmente, o rebanho brasileiro é composto de aproximadamente sete mil animais puros, no entanto, esta raça vem crescendo, com estimativas de alcançar 20 milhões de cabeças com sangue Brahman em 10 ou 15 anos. Sendo uma raça zebuína, o Brahman apresenta maior rusticidade e adaptação às regiões de clima quente, assim como o Nelore, raça de corte predominante no país. Maior precocidade sexual e de terminação e carcaça superior, podendo gerar produtos com mais arrobas ao desmame são características da raça Brahman que a tornam importante economicamente para cruzar com gado Nelore, resultando em animais adaptados, mais aptos para produção de carne e com maior precocidade (TOLEDO, 2004). A possibilidade do crescimento desta raça no país faz com que medidas de controle sejam tomadas para impedir a ocorrência de glicogenose, evitando as perdas econômicas decorrentes. Estas medidas de controle devem incluir a testagem de animais e sêmen adquiridos de outros países, principalmente porque estes últimos representam uma forma rápida de disseminação da doença.

Não foi relatada a ocorrência de casos anteriores de glicogenose generalizada tipo II em bovinos da raça Brahman no Brasil, sendo este o primeiro relato da doença no país. Esta doença deve ser levada em consideração no diagnóstico diferencial de outras doenças que cursam com fraqueza muscular em bovinos da raça Brahman e suas cruzas, uma vez que foi relatada a sua presença no Brasil.

## **6 - CONCLUSÕES**

1 - A doença de acúmulo lisossomal observada caracteriza-se como doença hereditária transmitida por genes recessivos em bovinos da raça Brahman.

2 – A lesão na musculatura esquelética, observada neste estudo, foi responsável pelo sinal clínico de fraqueza muscular, característico da doença em bovinos.

3 - A intensidade das lesões observadas no SNC foi semelhante nos três casos analisados, não sendo notadas variações entre os animais de idades diferentes.

4 - Através dos métodos moleculares foi possível determinar o gene envolvido nesses casos de glicogenose generalizada de bovinos Brahman e verificar que animais portadores desta doença ainda estão presentes no rebanho.

5 – As histoquímica de lectinas mostrou-se um método diagnóstico auxiliar na glicogenose generalizada.

6 - Glicogenose hereditária generalizada ocorre em bovinos Brahman no Brasil.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ASSOCIAÇÃO DOS CRIADORES DE BRAHMAN DO BRASIL. **A raça Brahman**. Disponível em: <<http://www.brahman.com.Br>>. Acesso em: 26 jan. 2005.
- ALROY J., ORGAD U., UCCI A. A., PEREIRA M. E. A. Identification of Glycoprotein Storage Diseases by Lectins. **The Journal of Histochemistry and Cytochemistry**. vol. 32, n. 12, p. 1280-1284, 1984.
- BIJVOET A. G. A., VAN DE CAMP E. H. M., KROSS M. A., DING J. H., YANG B. Z., VISSER P., BAKKER C. E., VERBEET M. Ph., OOSTRA B. A., REUSER A. J. J., VAN DER PLOEG A. T. Generalized glycogen storage and cardiomegaly in a knockout mouse model of Pompe disease. **Human Molecular Genetics**. vol 8, n. 1, p. 53-62, 1998.
- BROWN A. M. Brain glycogen re-awakened. **Journal of Neurochemistry**. p. 537-552, 2004.
- BROWN A. M., TEKKÖK S. B., RANSOM B. R. Glycogen regulation and functional role in mouse white matter. **J. Physiol**. vol. 549.2, p. 501-512. 2003.
- CARLTON , W. W., McGAVIN, M. D. Patologia veterinária especial de Thomson. 2. ed. Porto Alegre: ArtMed, 672 p, 1998.
- CHAMPE P. C., HARVEY R. A. **Metabolismo do Glicogênio**. In: Bioquímica ilustrada. cap. 13, pp. 141-152. 1996.
- CHEVILLE N. F. **Abnormal metabolic pathways**. In: Introduction to Veterinary Pathology. first ed. Iowa: Iowa State University Press. pp.94-95. 1988.
- COLODEL E. M., GARDNER D. R., ZLOTOWSKI P., DRIEMEIER D. Identification of Swainsonine as a glycoside inhibitor responsible for Sida carpinifolia poisoning. **Veterinary and Human Toxicology**. 44:177-178, 2002.
- COOMBS, NJ; GOUGH, AC & PRIMROSE, J. N. **Nucleic Acid Research**, vol 27, n.16, 3p.1999.
- COOK R. D., HOWELL M.C. C., DORLING P. R., RICHARDS R. B. Changes in nervous tissue in bovine generalized glycogenosis type II. **Neuropath. Appl. Neurobiol**. vol. 8, p. 95-107, 1982.
- DAMJANOV, I. Lectin cytochemistry and histochemistry. **Lab. Invest**. 57:5-20, 1987.
- DENNIS J. A., HEALY, P. J., REICHMANN, K. G. Genotyping Brahman cattle for generalised glycogenosis. **Aust. Vet. J.** vol. 80. n. 5., 2002.
- DENNIS J. A., MORAN C., HEALY P. J. The bovine  $\alpha$ -glucosidase gene: coding region, genomic structure, and mutations that cause bovine generalized glycogenosis. **Mammalian genome**. 11, 206-212, 2000.

- DORLING P. R., HUXTABLE C. R., VOGEL P. Lysosomal Storage in Swainsona spp. Toxicosis: an induced mannosidosis. **Neuropathology and applied Neurobiology**. vol. 4. p. 285-295, 1978.
- DRIEMEIER D, COLODEL E. M, GIMENO E. J, BARROS S. S. Lysosomal storage disease caused by *Sida carpinifolia* poisoning in goats. **Veterinary Pathology**. 37(2), 153-159, 2000.
- EDWARDS J. R. , RICHARDS R. B. Bovine generalized glycogenosis type II: a clinico-pathological study. **Br, vet. J.** 135, 338-348. 1979
- GIESELMANN V. Lysosomal storage diseases. **Biochimica et Biophysica Acta**. p. 103-136, 1995.
- GOLDSTEIN, I.J. AND HAYES, C.E. The lectins: carbohydrate binding proteins of plants and animals. **Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.** vol. 35, p.127-340, 1978.
- GOLDSTEIN, I.J., HAYES, R.C., MONSIGNY, M., OSAWA, T. AND SHARON, N. What should be called a lectin?. **Nature** 285, 66, 1980.
- HARTLEY W. J. Some observations on the pathology of Swainsona spp. poisoning in farm livestock in Eastern Australia. **Acta Neuropathol** (Berl).18(4):342-55, 1971.
- HEALY P. J. Testing for undesirable traits in Cattle: An Australian perspective. **J. Animal Science**. 74: 917-922. 1996.
- HEALY P. J., SEWELL C. A., NIEPER R. E., WHITTLE R. J., REICHMANN K. G. Control of generalised glycogenosis in a Brahman herd. **Aust. Vet J**, vol. 64. n. 9. p. 278-280, 1987.
- HENNIGAR R. A, SCHULTE B. A, SPICER S. S. Histochemical detection of glycogen using *Griffonia simplicifolia* agglutinin II. **Histochem J**. 18, 589-596, 1986.
- HESSELINK R. P., WAGENMAKERS A. J. M., DROST M. R., VAN DER VUSSE G. J. Lysosomal dysfunction in muscle with special reference to glycogen storage disease type II. **Biochimica et Biophysica Acta**. p. 164-170, 2003.
- HOWELL J. MCC., DORLING, P. R., COOK, R. D., ROBINSON, W. F., BRADLEY, S., GAWTHORNE, J. M. Infantile and late onset form of generalised glycogenosis type 2 in cattle. **J. Pathol.**, vol. 134. p.266-277, 1981.
- HUXTABLE C. R. and DORLING P. R. Poisoning of livestock by *Swainsona* spp.: current status. **Aust. Vet. J.** vol. 59. p. 50-53, 1982.
- ITO T, NEWKIRK C, STRUM J. M, MCDOWELL E. M. Modulation of glycogen stores in epithelial cells during airway development in Syrian golden hamsters: a histochemical study comparing *Concanavalin A* binding with the periodic acid-Schiff reaction. **J Histochem Cytochem**. 38, 691-697, 1990.

- JOLLY R. D. Screening for genetic diseases in cattle. **Aust. Vet. J.**, vol. 80, n. 5, 2002.
- JOLLY R.D., HARTLEY, W. J., PATH, F. R. C. Storage disease of domestic animals. **Aust. Vet. J.**, vol. 53, 1977.
- JOLLY R.D., WALKLEY S. U. Lysosomal Storage Diseases of Animals: An Essay in Comparative Pathology. **Vet. Pathol.**, vol. 34. p. 527-548, 1997.
- JOLLY R. D. Animal Model of Human Disease. Mannosidosis of Children, Other Inherited Lysosomal Storage Disease. **American Journal of Pathology.** vol. 74, n.1, 1974
- JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia básica.** 9. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan., 427 p. 1999.
- KING, N. W., ALROY, J. Deposições intracelulares e extracelulares; degenerações. In: JONES T. C., HUNT., R. D., KING, N. W. **Patologia Veterinária.** 6 ed. São Paulo: Manole, cap. 2, p. 27-59. 2000.
- KIKUCHI. T., YANG H. W., PENNYBACKER M., ICHIARA N., MIZUTANI M., VAN HOVE J. L. K., CHEN YUAN TSONG. **J. Clin. Invest.** Clinical and metabolic correction of Pompe disease by enzyme therapy in acid maltase-deficient quail. 101(4) 827-833. 1998.
- KONG J., SHEPEL P. N., HOLDEN C. P., MACKIEWICZ M., PACK A. I., GEIGER J. D. Brain glycogen decreases with increased periods of wakefulness: implications for homeostatic drive to sleep. **The Journal of Neuroscience.** 22(13), p. 5581-5587. 2002.
- KRANER SIMONE., SIEB J. P., THOMPSON P. N., STEINLEIN O. K. Congenital myathenia in Brahman calves caused by homozygosity for a CHRNE truncating mutation. **Neurogenetics.** vol. 4. p. 87-91 2002.
- KUMAR V, ABBAS A. K., FAUSTO N. Genetic Disorders. In: **Robbins and Cotran Pathologic Basis of Disease.** 7 ed. Philadelphia: W. B. Saunders. Cap.5 pp.165-168, 1999.
- LEIPOLD H. W., DENNIS S. M. **Congenital defects affecting bovine reproduction.** In: Morrow D. A. Current therapy in Theriogenology. (ed.) W. B. Saunders Company, Philadelphia, P A. pp-410-441. 1980.
- MANKTELOW, B. W., HARTLEY, W. J. **J. Comp. Path.** Generalized glycogen storage disease in sheep. 85, 139. 1975.
- MATSUI T., KURODA S., MIZUTANI M., KIUCHI Y., SUZUKI K., ONO T. Generalized Glycogen Storage Disease in Japanese Quail (*Coturnix coturnix japonica*). **Vet. Pathol.**, vol 20. p. 312-321, 1983.
- MICHALSKI J. C., KLEIN A. Glycoprotein lysosomal storage disorders:  $\alpha$  and  $\beta$  mannosidosis, fucosidosis and  $\alpha$ -N-acetylgalctosaminidase deficiency. **Biochimica et Biophysica Acta.** p. 69-84. 1999.

- MILLER, S. A.; DYKES D. D.; POLESKY, H. F. **Nucleic Acid Research**, vol 16, n 3, p. 1215, 1988.
- MOLINEUX R. J, JAMES L. F. Loco intoxication: Indolizidine alkaloids of spotted locoweeds (*Astragalus lentiginosus*). **Science**. 216: 190-191, 1982.
- O'SULLIVAN B. M., HEALY P. J, FRASER, I. R., NIEPERS, R. E, WHITTLE, R. J., SEWELL, C. A. Generalised glycogenosis in Brahman cattle. **Aust Vet J**. vol. 57, Maio, 1981.
- PIENAAR J. G, KELLERMAN T. S, BASSON P. A, JENKINS W. L, VAHRMEIJER J. **Br. Onderstepoort J Vet Res**. Maldronksiekte in cattle: a neuronopathy caused by *Solanum kwebense* N.E. 43(2):67-74, 1976.
- PLATT F. M., WALKLEY S. U. Lysosomal defects and storage. In: **Lysosomal disorders of the brain**. Ch. 2, pp. 32-49. 2004.
- PROPHET, E.B.; MILLS, B.; ARRINGTON, J.B.; SOBIN, L.H. **Laboratory methods in histotechnology**. Armed Forces Institute of Pathology. American Registry of Pathology, Washington, 1992. 279p.
- RADOSTITS O. M., GAY C. C., BLOOD D. C., HINCHCLIFF K. W. Doenças do sistema músculo esquelético. **Clínica veterinária: Um tratado de doenças dos Bovinos, Ovinos, Suínos, Caprinos e Equinos**. 9 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. pp. 493-516. 2002.
- REICHMANN, K. G., TWIST, J. O., THISTLETHWAITE E. J. Clinical, diagnostic and biochemical features of generalised glycogenosis type II in Brahman cattle. **Aust Vet J**. 70 (11):405-8, 1993.
- REICHMANN, K. G., TWIST, J. O., MCKENZIE R. A., ROWAN K. J. Inhibition of bovine  $\alpha$ -glucosidase by *Castanospermum australe* and its effect on the biochemical identification of heterozygotes for generalised glycogenosis type II (Pompe's disease) in cattle. **Aust Vet. J**. vol. 64, n. 9, 1987.
- RIET-CORREA F., MENDEZ M. D., SCHILD A. L., SUMMERS B. A., OLIVEIRA J. A. Intoxication by *Solanum fastigiatum* var. *fastigiatum* as a cause of cerebellar degeneration in cattle. **Cornell Vet**. 73(3), 240-256. 1983.
- SAMBROOK, J., RUSSELL, D. W. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual**, the third edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 2001.
- SANDSTROM, B., WESTMAN, J., OCKERMAN, P, A. **Acta Neuropathol**. Glycogenosis of the central nervous system in the cat. 14(3):194-200. 1969.
- SCHILD, A. L., Defeitos congênitos. Cap 1, pp. 19-43. In: Riet-Correa, F., Schild, A. L., Lemos, R. A. A. **Doenças de ruminantes e eqüinos**. Livraria Varela, São Paulo. 2001.
- SHI SHANG-RONG, COTE R. J., WU L., LIU C., DATAR R., SHI Y., LIU D., LIM



H., TAYLOR C. R. DNA extraction from Archival formalin-fixed, paraffin-embedded tissue sections based on the antigen retrieval principle: heating under the influence of pH. **The Journal of Histochemistry & Cytochemistry**. vol. 50(8) 1005-1011. 2002.

SPICER S. S. AND SCHULTE B. A. Detection and differentiation of glycoconjugates in various cell types by lectin histochemistry. **Bas. Appl. Histochem.** p.307-30, 1988.

STEGELMEIER B. L., MOLYNEAUX R. J., ELBEIN A. D., JAMES L. F. The Lesions of Locoweed (*Astragalus mollissimus*), Swainsonine, and Castanospermine in Rats. **Vet. Path.** vol. 32, p. 289-298, 1995.

SUMMERS B., CUMMINGS J. F., DE LAHUNTA A. **Veterinary Neuropathology**. Ch. 5: Degenerative diseases of the central nervous system. pp. 208-350. Mosby: St. Louis, 1995.

TOKARNIA C. H., DÖBEREINER J. CANELLA C. F. C. Estudo experimental sobre a toxidez do “canudo” (*Ipomoea fistulosa* Mart.) em ruminantes. **Arqs Inst. Biol. Animal**. Rio de Janeiro. 3:59-71, 1960.

TOLEDO L. R. Zebu Americano. *Globo Rural*. Editora Globo, Rio de Janeiro. Ano 19. n. 222, p.28-34. 2004

UMAPATHYSIVAM K., HOPWOOD J.J., MEIKLE P.J. Determination of acid alfa-glucosidase activity as a diagnostic test for Pompe disease. **Clinical Chemistry**. 47:1378-1383, 2001.

VAN KAMPEN K. R., JAMES L. F. Sequential Development of the Lesions in Locoweed Poisoning. **Clinical Toxicology**. vol. 5. p. 575-580. 1972.

WALVOORT H. C. Glycogen storage disease type II in the Lapland dog. **The Veterinary Quarterly**. vol. 7, n. 3, p. 187-190, 1985.

WARREN C. D., ALROY J. Morphological, biochemical and molecular biology approaches for the diagnosis of lysosomal storage diseases. **J. Vet. Diagn Invest**. n. 12, p. 483-496. 2000

WISSELAR H. A., HERMANS M. M. P., VISSER W. J, KROOS M. A., OOSTRA B. A., ASPDEN W., HARRISON B., HETZEL, D. J. S, REUSER A. J. J., DRINKWATER R. D. Biochemical genetics of glycogenesis type II in Brahman cattle. **Bioch. Bioph Res. Comm.** vol. 190, n. 3, 1993.