

**UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA
FACULTAD DE VETERINARIA**

**MIELOPATÍA DEGENERATIVA CANINA, ACTUALIZACIÓN EN HERRAMIENTAS
DE DIAGNÓSTICO, TRATAMIENTO Y PREVENCIÓN**

por

María Victoria DAVILA PÉREZ

TESIS DE GRADO presentada como uno
de los requisitos para obtener el título de
Doctor en Ciencias Veterinarias.

Orientación: Medicina.

MODALIDAD: Revisión Monográfica

MONTEVIDEO

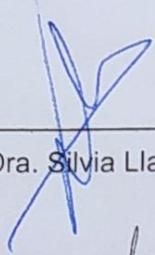
URUGUAY

2022

PÁGINA DE APROBACIÓN

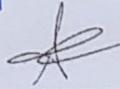
Tesis de grado aprobada por:

Presidente de mesa:



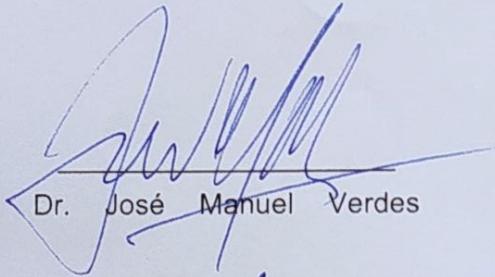
Dra. Silvia Llambi

Segundo miembro (Tutor):



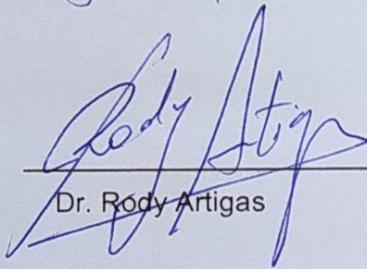
Dra. Alejandra Mondino

Tercer miembro:



Dr. José Manuel Verdes

Cuarto miembro:



Dr. Rody Artigas

AGRADECIMIENTOS

Me gustaría agradecer a Ale y Rody, mis tutores, quienes me apoyaron desde el inicio de la tesis, me han motivado en esta etapa final y confiaron en mí, tanto para la realización de la revisión como para otras actividades académicas. Aprendí mucho con ellos.

También a la Facultad, docentes, funcionarios y compañeros por brindarme un excelente ambiente para crecer.

A mi familia. Mamá y Papá, que son responsables de todo lo que soy y me brindaron la oportunidad de estudiar y desempeñarme en lo que me gusta. A Leo, Mau y Sam, que siempre están, me han apoyado en cada momento de festejo y en cada tropezón.

A mis amigas. Las de la vida y las que me dió la Facultad, no hay forma de agradecer su compañía durante toda la carrera.

TABLA DE CONTENIDO

PÁGINA DE APROBACIÓN	2
AGRADECIMIENTOS	3
LISTA DE CUADROS Y FIGURAS.....	6
CUADROS	6
FIGURAS	6
RESUMEN.....	7
SUMMARY	8
1. INTRODUCCIÓN	9
2. OBJETIVOS	12
2.1. Objetivo general:	12
2.2. Objetivos específicos:	12
3. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	13
3.1. Anatomía y fisiología de la médula espinal.	13
3.2. Neurolocalización de lesiones en la médula espinal	20
3.3. Etiologías de patologías medulares	23
4. MIELOPATÍA DEGENERATIVA.	23
4.1. MD y Esclerosis Lateral Amiotrófica.....	24
4.2. Fisiopatología de MD.....	25
4.3. Rol de la SOD 1 mutada: nueva función tóxica	26
4.4. Estrés del RE	27
4.5. Rol de las células gliales en la MD	27
4.6. Signos clínicos de MD	28
4.7. Diagnóstico de MD	30
4.8. Diagnóstico diferencial	30
4.9. Diagnóstico confirmatorio: histopatología	30
4.10. Pruebas disponibles para genotipado del gen SOD1	31
4.11. Búsqueda de biomarcadores de MD	33
4.11.a. Detección de miARNs	33
4.11.b. Detección de neurofilamentos fosforilados.	34
4.12. Tratamiento	35
4.12.a. Terapia de Rehabilitación	36
4.12.b. Uso de nutracéuticos.	40

4.12.c. Terapia con Células Madre	41
4.12.d. Terapia Génica.....	43
4.12.e. Terapia con cannabinoides	45
5. CONCLUSIONES.....	47
6. BIBLIOGRAFÍA	48

LISTA DE CUADROS Y FIGURAS

CUADROS

	Página
Cuadro 1. Signos clínicos neurológicos por segmento medular afectado.....	22
Cuadro 2. Escala de signos clínicos de MD en función del progreso de la enfermedad	29
Cuadro 3. Protocolos A y B utilizados para terapia con fotobiomodulación.....	38

FIGURAS

	Página
Figura 1. Esquema de una neurona.....	13
Figura 2. Vainas de mielina en el SNC y SNP.....	14
Figura 3. Corte transversal del séptimo segmento lumbar.....	15
Figura 4. Relaciones anatómicas entre la médula espinal y los segmentos vertebrales en caninos.....	16
Figura 5. Nervios espinales.....	17
Figura 6. Láminas y núcleos de la sustancia gris de diferentes segmentos medulares.....	18
Figura 7. Tractos medulares sensitivos y motores de más relevancia en la clínica.....	19
Figura 8. Esquema de signos clínicos neurológicos en función de la localización de la afección medular.....	23
Figura 9. Canino con signos iniciales de MD.....	28
Figura 10. Cortes histológicos de segmentos medulares torácicos, teñidos con Luxol Fast Blue combinada con Periodic Acid-Schiff, de canino con MD (A) y canino sano (B).....	31
Figura 11. Patrones electroforéticos para la mutación SOD1:c.118G > A en “Molecular screening for the mutation associated with canine degenerative myelopathy (SOD1:c.118G > A) in German Shepherd dogs in Brazil”.....	32

RESUMEN

La Mielopatía Degenerativa Canina es una enfermedad hereditaria de curso insidioso y pronóstico devastador para caninos de edad adulta. Se trata de una afección neurodegenerativa que inicia en la región toracolumbar de la médula espinal y avanza hacia zonas craneales y caudales de la misma, dando como resultado un cuadro de ataxia propioceptiva de miembros posteriores que progresa a paraplejia, en los primeros 6 meses al año de evolución, y, que en estadios más avanzados lleva a cuadriplejia, incontinencia urinaria y fecal, entre los signos clínicos más importantes. El cuadro descrito conduce a la elección de la eutanasia por parte de los propietarios en algún punto de este proceso o culmina en muerte natural, ya que no se cuenta con un tratamiento curativo. La neurodegeneración es asociada a la presencia de mutaciones en el gen que codifica a la enzima Superóxido Dismutasa 1, las cuales llevan a su alteración estructural y funcional desencadenando fenómenos celulares que continúan siendo estudiados. El mecanismo de herencia que presenta es autosómico recesivo con penetrancia incompleta, aspecto que agrega complejidad al diagnóstico y control de la misma. En adición a esto, actualmente no se cuenta con estrategias de diagnóstico confirmatorio antemortem, el diagnóstico confirmatorio se realiza postmortem en base a lesiones histopatológicas características. En esta revisión bibliográfica, se han detallado aspectos de su epidemiología, patogenia, presentación clínica, herramientas diagnósticas y alternativas terapéuticas disponibles, así como las que se encuentran en investigación; con el objetivo de exponer de forma crítica las actualizaciones en diagnóstico, tratamiento y prevención.

SUMMARY

Canine Degenerative Myelopathy is a hereditary disease with an insidious course and devastating prognosis for adult dogs. It is a neurodegenerative condition that begins in the thoracolumbar region of the spinal cord and progresses to the cranial and caudal areas of the spinal cord, resulting in proprioceptive ataxia of the hind limbs that progresses to paraplegia, in the first 6 months to one year of evolution. In more advanced stages, leads to quadriplegia, urinary and fecal incontinence, among the most important clinical signs. The described clinical signs lead to the choice of euthanasia by the owners at some point in this process or culminates in natural death, since there is no curative treatment. Neurodegeneration is associated with the presence of mutations in the gene that encodes the enzyme Superoxide Dismutase 1, which lead to its structural and functional alteration, triggering cellular phenomena that continue to be studied. Its inheritance mechanism is autosomal recessive with incomplete penetrance, an aspect that adds complexity to its diagnosis and control. In addition to this, there are currently no antemortem confirmatory diagnostic strategies, the confirmatory diagnosis is made postmortem based on characteristic histopathological lesions. In this bibliographic review, aspects of its epidemiology, pathogenesis, clinical presentation, diagnostic tools and available therapeutic alternatives have been detailed, as well as those that are under investigation; with the aim of critically exposing updates in diagnosis, treatment and prevention.

1. INTRODUCCIÓN

Las enfermedades neurológicas son una de las principales causas de muerte en caninos (Fleming et al., 2011; O'Neill et al., 2013). Dentro de estas, las patologías que afectan la médula espinal son una de las más frecuentes (Fluehmann, Doherr y Jagger, 2006; Mondino, Piaggio, Loureiro, Vasconcellos, y Delucchi, 2015; Pellegrino, Pacheco y Vazzoler, 2011). Estas enfermedades provocan efectos devastadores en los perros, como, por ejemplo, intenso dolor, paresia o parálisis, incontinencia urinaria y/o fecal, entre otros, volviéndose los pacientes altamente dependientes de sus propietarios (Šulla, Balik, Horňák y Ledecký, 2018; Webb, Ngan y Fowler, 2010). Además, algunas de estas patologías requieren de costosos tratamientos quirúrgicos y de largos periodos de rehabilitación para lograr la recuperación del paciente. Otras, como aquellas de naturaleza degenerativa, presentan malos pronósticos de sobrevida ya que la función medular desmejora progresivamente, siendo de elección la eutanasia del animal. Sumado a esto, muchos animales luego de lesiones medulares severas, presentan secuelas permanentes (Jeffery, Levine, Olby y Stein, 2013; Šulla et al., 2018).

Existen diversos factores etiológicos ligados a las afecciones medulares. La regla nemotécnica "VITAMIN D", permite organizar las patologías en: vasculares, idiopáticas, traumáticas o tóxicas, anomalías congénitas, metabólicas, infecciosas y/o inflamatorias, neoplásicas y degenerativas. Algunas de estas etiologías pueden tener a su vez, un origen genético (Pellegrino, 2013).

Las enfermedades genéticas, constituyen un grupo heterogéneo de patologías caracterizadas por alteraciones en el genoma del individuo. Dichas alteraciones son causadas por mutaciones patógenas; ya sea, de un gen en particular o de múltiples genes. Estas mutaciones pueden ocurrir durante la vida de un individuo por azar o por exposición a sustancias mutagénicas, pero únicamente aquellas que ocurren en el ADN de células germinales pueden ser transmitidas a la descendencia. Si bien, la mutación original ocurre solamente en las células de la línea germinal, los individuos que la hereden poseerán esa mutación en todas las células de su organismo (Nussbaum, McInnes, Willard y Amosh, 2016). A las enfermedades causadas por mutaciones genéticas que fueron transmitidas por los progenitores las conocemos como enfermedades hereditarias (Jackson, Marks, May y Wilson, 2018).

Una de las principales patologías hereditarias que afecta la médula espinal de los caninos es la Mielopatía Degenerativa (MD) (OMIA 000263-9615). La MD es una enfermedad degenerativa fatal, que se hereda de forma autosómica recesiva con penetrancia incompleta. Afecta principalmente la región toracolumbar de la médula espinal y se manifiesta clínicamente con ataxia y paresia progresiva de los miembros posteriores que progresa a paraplejia, llevando, en muchas ocasiones, a la elección de eutanasia por parte de los propietarios (Coates et al., 2007; Coates, 2014; Dewey y da Costa, 2016). El curso clínico de esta enfermedad puede variar de 6 meses a 1 año después del diagnóstico. Generalmente afecta a caninos mayores de 5 años, sobre todo en animales de porte mediano a grande, con la raza Ovejero Alemán (raza en qué fue diagnosticada la enfermedad por primera vez), como gran representante. También ha sido reportada en Corgi galés de Pembroke, Boxer, Rodesiano de

Ridgeback, Retrievers de Chesapeake, Boyero de Berna, Caniche miniatura y estándar, Pug, Husky Siberiano, Cavalier King Charles Spaniel, Esquimal Americano, Corgi Galés de Cardigan, Golden Retriever, Kerry Blue Terrier, Soft Coated Wheaten Terrier, Wirehaired Fox Terrier (OMIA 2022).

Múltiples hipótesis acerca de su origen han sido discutidas, existiendo sospechas de un origen nutricional o inmunomediado. Sin embargo, Awano et al. (2009) identificaron en caninos Corgi galés de Pembroke que la MD se encuentra asociada a una mutación (c.118G > A) en el gen que codifica para la enzima Superóxido dismutasa 1 (SOD 1), lo que modificó el camino de investigación acerca de su origen y patogenia (Awano et al., 2009; Pellegrino, 2013). Posteriormente, Wininger et al. (2011) reportaron una nueva mutación en SOD1 (c.52A > T) en la raza Boyero de Berna. Ambas mutaciones conllevan a alteraciones en un único aminoácido de la SOD1 (Awano et al., 2009; Kobatake et al., 2017; Wininger et al., 2011) lo que modifica su función y desencadena un proceso degenerativo de las neuronas motoras. Los mecanismos de este proceso no son del todo conocidos y, hasta el día de hoy, se siguen describiendo fenómenos moleculares y celulares asociados a la misma (Chang et al., 2019; Kimura et al., 2020; Kobatake et al., 2017). Sin embargo, se ha confirmado que la falla en la función de la SOD1 lleva a la agregación citoplasmática de formaciones aberrantes de agregados proteicos en neuronas y células gliales. A su vez, la SOD 1 induce estrés en el retículo endoplasmático lo que lleva a la apoptosis celular (Chang Parakh, Coates, Long, y Atkin, 2019).

Al tratarse de una patología que se manifiesta en perros adultos, la presión de la selección natural es ineficiente en reducir la frecuencia del alelo mutado, además, dado que la enfermedad presenta penetrancia incompleta, no todos los animales homocigotas recesivos presentarán la enfermedad (Zeng et al., 2014).

La patogénesis y signos clínicos de la MD son muy similares a la de la Esclerosis Lateral Amiotrófica (ELA) en humanos. Esto, sumado a no se ha logrado reproducir la fisiopatología de la neurodegeneración que ocurre en humanos en los modelos murinos, ha llevado a que la MD sea considerada el principal modelo animal de estudio de la ELA (Kobatake et al., 2017; Nardone et al., 2016). Gracias a esto, la mayoría de los estudios de la MD han sido realizados con la finalidad de avanzar en el conocimiento de la ELA, lo cual ha permitido grandes progresos en el diagnóstico, tratamiento y control de la MD.

Si bien aún no existe ningún diagnóstico antemortem definitivo de la MD, este se obtiene postmortem mediante histopatología de los tejidos afectados. Existe un test disponible para detectar si los caninos son heterocigotos, homocigotos recesivos o no presentan la mutación c.118G > A, sin embargo, este no resulta confiable para el diagnóstico confirmatorio de animales enfermos, ya que el mismo puede estar padeciendo otra patología de sintomatología similar siendo homocigota (Story et al., 2020) e incluso nunca desarrollarla. Estudios recientes se inclinan por la evaluación de la potencialidad de la detección de biomarcadores en plasma, como microRNAs (Nakata et al., 2019).

Hasta el momento, no se ha hallado cura para la MD. Diversas terapias paliativas son utilizadas con el fin de mejorar los signos clínicos y enlentecer su progresión. Algunos de estos son el uso de drogas inmunosupresoras, complejos vitamínicos y fisioterapia (Kathmann, Cizinauskas, Doherr, Steffen y Jaggy, 2006; Miller, Torraca y de Taboada, 2020; Xie, Dewey, Pi y Cao, 2018), sin embargo, se han obtenido resultados poco alentadores (Pellegrino, 2013; Story et al., 2020).

En la actualidad, se han desarrollado diversos estudios que evalúan la eficacia de nuevas opciones terapéuticas para el tratamiento de ELA que podrían ser utilizados potencialmente para tratar la MD. Una de ellas es la terapia génica que además se ha estudiado en modelos de investigación de Alzheimer, Parkinson y enfermedad de Huntington. Un ejemplo de esto es la inyección de vectores que transportan oligonucleótidos sintéticos para reducir la acumulación de proteínas tóxicas que se generan en los procesos degenerativos (Smith et al., 2006). Si bien hasta el momento no se ha reportado su eficacia en caninos, la Universidad de Tufts se encuentra realizando ensayos clínicos en perros afectados con MD (Rajewski, 2017). Además, a nivel experimental y en ensayos clínicos con humanos, se han evaluado otras terapias innovadoras como la terapia celular y el tratamiento con cannabinoides (Meyer et al., 2019; Nayak, Kim, Goldman, Keirstead, Kerr, 2006).

Dado que la MD es una patología con un cuadro clínico muy desfavorable y con un ineludible pronóstico funcional y vital; la medicina preventiva toma una posición de importancia para enfrentarla. Considerando que las manifestaciones clínicas se expresan solo en caninos homocigotas recesivos, que ocurren en la edad adulta, y que no todos los homocigotas recesivos los presentan, es posible que estos individuos dejen descendencia, heredando el alelo mutante. Por este motivo, se destaca la necesidad de detectar por pruebas moleculares a los homocigotas recesivos y a los heterocigotas, a los efectos de controlar la diseminación del alelo en las poblaciones. Por lo anteriormente expuesto, resulta de utilidad realizar una revisión bibliográfica que detalle e integre el estado actual del conocimiento acerca de los métodos de diagnóstico y prevención, así como de las terapias disponibles y de aquellas que están siendo investigadas para la resolución de la MD.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo general:

Realizar una revisión bibliográfica sobre la MD en caninos, las herramientas disponibles para su diagnóstico y prevención, así como los tratamientos actuales y experimentales para la mejora de los signos clínicos de esta enfermedad.

2.2. Objetivos específicos:

- a) Describir la fisiopatología de la MD en caninos.
- b) Describir y comparar las herramientas diagnósticas disponibles, sus ventajas y desventajas, su utilidad y control en la MD.
- c) Describir y comparar las medidas terapéuticas utilizadas y disponibles, los beneficios y efectos adversos que presentan.
- d) Exponer fundamentos y resultados de las nuevas terapias para MD que están siendo investigadas.

3. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

3.1. Anatomía y fisiología de la médula espinal.

El Sistema Nervioso constituye la totalidad del tejido nervioso de un ser vivo y tiene como principal finalidad la transmisión de información entre distintas regiones del organismo y su procesamiento. Según su localización se clasifica en Sistema Nervioso Central (SNC) y Sistema Nervioso Periférico (SNP). El SNC se compone del encéfalo y de la médula espinal, mientras que, el tejido nervioso restante, conforma el SNP (Farley, Johnstone, Hendry y McLafferty, 2014).

A nivel histológico, el tejido nervioso está conformado por dos grupos celulares principales: las células nerviosas (neuronas) y las células gliales (neuroglia). Las primeras corresponden a células muy especializadas que se encargan de la transmisión de información mediante la forma de un potencial de acción. Es posible diferenciar en las neuronas cuatro principales estructuras celulares: el cuerpo celular, dos tipos principales de ramificaciones (las dendritas y el axón) y las terminales presinápticas (Kandel), estos han sido esquematizados en la Figura 1. El cuerpo celular también es denominado soma o pericarion y es allí donde se ubican el núcleo y los organelos. Las dendritas suelen ser varias ramificaciones cortas y son el aparato principal de recepción de señales transmitidas por otras neuronas, mientras que el axón, es una prolongación única y tubular encargada de la transmisión de información (Aige y Morales, 2012)

Por último, las terminales o botones sinápticos son engrosamientos de la porción final de las ramificaciones de los axones. Tienen como función la liberación de neurotransmisores que pueden excitar o inhibir a la célula receptora. La comunicación entre dos neuronas se da a través de la sinapsis, el sitio de unión entre los botones terminales del axón de la neurona que envía un mensaje y el soma o las dendritas de la neurona que lo recibe (Aige y Morales, 2012).

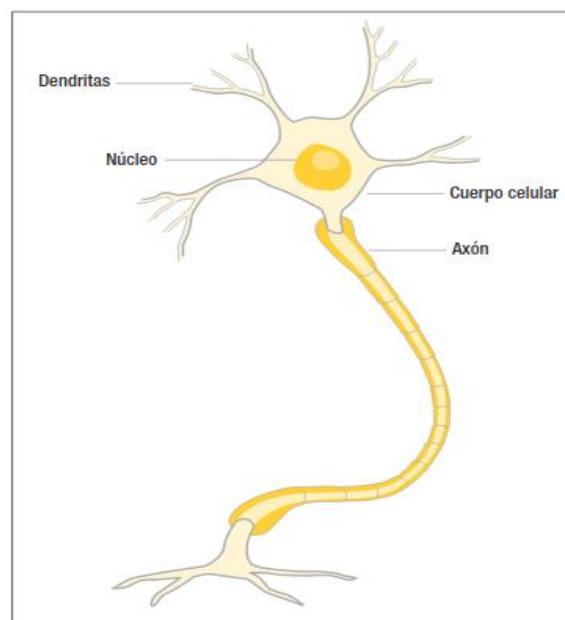


Figura 1. Esquema de una neurona. Extraído de Aige y Morales (2012).

Por otra parte, las células de la neuroglia son claves en el soporte del SN. Astrocitos, oligodendrocitos, microglía y ependimocitos, son los representantes de este grupo celular en el SNC (Aige y Morales, 2012). Los primeros son células que realizan funciones importantes de soporte físico a las neuronas, aseguran un entorno químico adecuado para la transmisión neuronal y proveen de nutrientes a las neuronas (Aige y Morales, 2012).

Los oligodendrocitos son los que se ocupan de formar la mielina de los axones a nivel del SNC, lo cual es clave en la transmisión del impulso nervioso. La misma es un compuesto proteolipídico que envuelve a algunos axones (con una disposición en vaina) funcionando como aislante para aumentar la velocidad de transmisión (Figura 2.A). En el SNP, por otra parte, las células que desempeñan esta función son las denominadas células de Schwann (Figura 2.B) (Aige y Morales, 2012).

Se denomina microglía a células pequeñas, de tipo mononucleares fagocíticas que accionan en procesos de reparación del tejido nervioso. Por último, los ependimocitos conforman el epitelio que tapiza los plexos coroideos y ventrículos del encéfalo, y el canal central de la médula (Aige y Morales, 2012). Los ventrículos son estructuras cavitarias ubicadas en regiones del encéfalo, mientras que, el canal central, es una cavidad que abarca toda la extensión de la médula espinal ubicado en la región central de la misma. En estas cavidades se aloja el líquido cefalorraquídeo (LCR), líquido transparente e incoloro que proporciona protección, soporte y nutrición al SNC. El LCR es un ultrafiltrado del plasma que se genera en capilares del SNC y de las meninges; siendo el lugar de mayor producción los plexos coroideos de los ventrículos lateral, tercero y cuarto (De Lahunta, Glass y Kent, 2015).

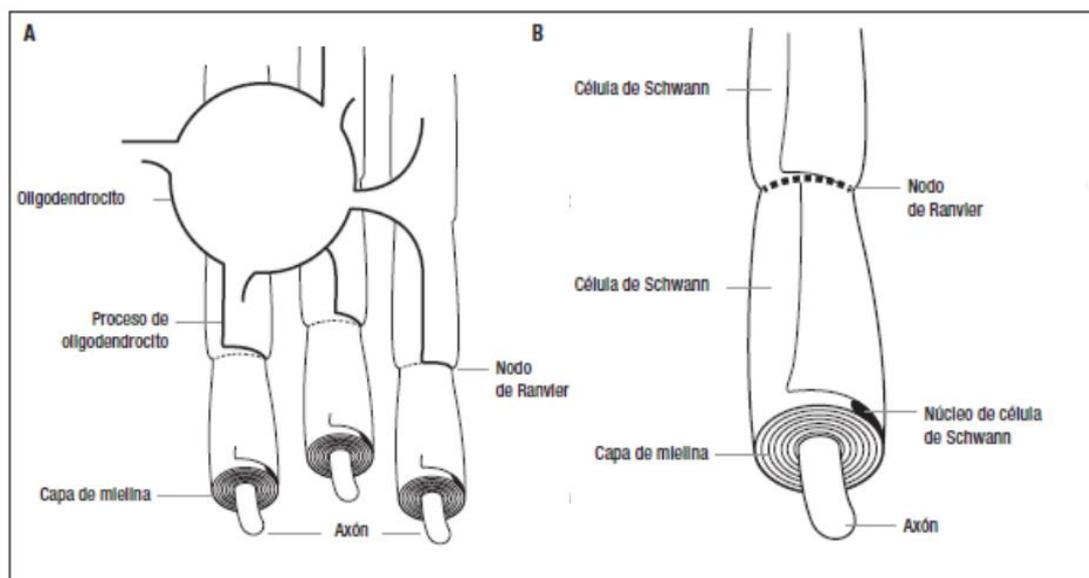


Figura 2. Vainas de mielina en el SNC y SNP. A. Axones de SNC con vainas de mielina formadas por un oligodendrocito. B. Axón de SNP con su vaina de mielina formada por células de Schwann. Extraído de Aige y Morales (2012).

El sistema ventricular y el canal central se encuentran comunicados con las meninges, por lo que el LCR viaja en espacios entre las mismas. Las meninges son tres capas que envuelven al SNC para conferirle protección. Estas se denominan

duramadre, aracnoides y piamadre (Figura 3). La duramadre es la capa más externa, fibrosa y delgada. La aracnoides es la central, constituida por trabéculas que la conectan con la piamadre, entre estas es que se aloja y se secreta parte del LCR. Por su parte, la piamadre, la capa más interna, se encuentra en contacto con las células gliales y posee una vasta vascularización; en la médula espinal se conecta con la duramadre mediante ligamentos denticulados que contribuyen en la fijación del órgano (Figura 3) (De Lahunta, Glass y Kent, 2016; Fletcher, 2013; Šulla et al., 2018).

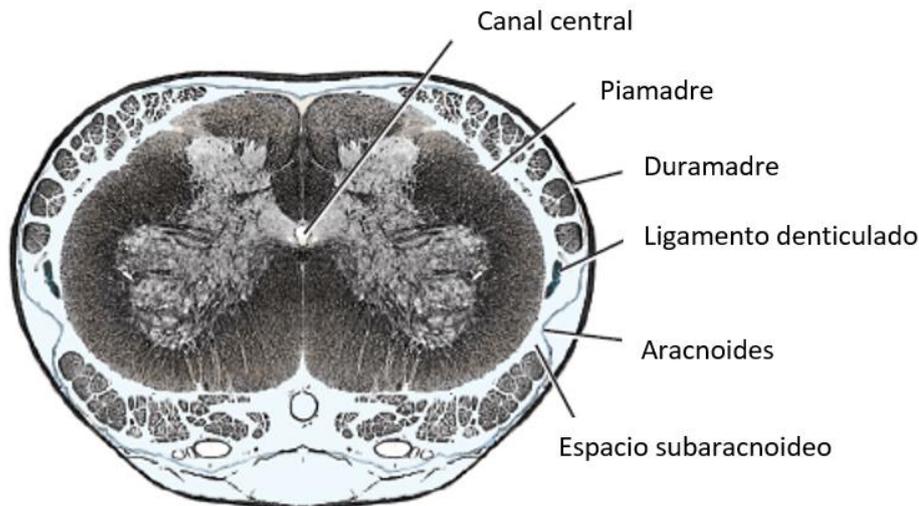


Figura 3. Corte transversal del séptimo segmento lumbar donde se identifican las meninges y estructuras asociadas. Modificado de De Lahunta et al. (2015).

En lo que respecta al SNC, es posible destacar que el encéfalo, conformado por cerebro, tronco encefálico y cerebelo, se aloja dentro de cavidad craneana. Y que, la médula espinal transcurre a lo largo del canal vertebral de la columna vertebral originándose a continuación de la porción más caudal del tronco encefálico (denominada médula oblonga), a nivel del agujero magno y finalizando en el cono medular, el cual, se extiende hasta la región de las vértebras lumbares 6 y 7 en caninos (Fletcher, 2013).

Al abarcar más detalladamente la estructura de la médula espinal, se identifican múltiples segmentos, en función de similitudes anatómicas e histológicas de los mismos, lo cual facilita su estudio (Figura 4). En caninos se distinguen ocho segmentos cervicales (C1-C8), trece torácicos (T1-T13), siete lumbares (L1-L7), tres sacros (S1-S3) y cinco caudales (C1-C5). Los segmentos se disponen dentro de los cuerpos vertebrales que llevan su mismo nombre, a excepción de los dos primeros segmentos cervicales, del octavo segmento cervical, de algunos segmentos lumbares y de los segmentos sacros y caudales. Cuanto más caudal es el segmento medular considerado, más alejado hacia craneal se encuentra del cuerpo vertebral que lleva su nombre (Figura 4) (De Lahunta et al., 2016; Dewey y Da Costa, 2016; Fletcher, 2013). Esto se debe a que, en las primeras etapas de la gestación la velocidad de crecimiento embrionario de la médula espinal y de la columna vertebral son similares, pero en las últimas etapas, el crecimiento de la médula se enlentece con respecto al

de la columna. Este crecimiento diferencial se continúa hasta la vida adulta (De Lahunta et al., 2016).

El diámetro de los segmentos es variable, siendo de relevancia la presencia de dos ensanchamientos de la médula correspondientes a una mayor densidad de células neuronales en las regiones de C6-T2 y L4-S3. Estos se denominan intumescencias cervical y lumbar respectivamente. Desde dichas intumescencias emergen los nervios que forman los plexos braquial y lumbosacro, los cuales inervan a los miembros torácicos y pelvianos (Fletcher, 2013).

A lo largo de la médula, a partir de cada segmento medular emergen dos nervios espinales, derecho e izquierdo, que resultan de la unión de las raíces dorsales (sensitivas) y ventrales (motoras) de cada lado (Figura 5). Los nervios espinales van a atravesar los forámenes vertebrales de la vértebra que les corresponde numéricamente. Por lo tanto, se observa que los nervios espinales más craneales, como los cervicales, torácicos, tienen una longitud menor a la de los nervios más caudales, los cuales, al encontrarse los segmentos ubicados más cranealmente a los forámenes vertebrales, deben hacer un recorrido mayor para atravesar los forámenes intervertebrales correspondientes (Fletcher, 2013). Hacia la porción distal de la médula, se identifica la cauda equina, conformada por las raíces de nervios de segmentos lumbares (a partir de L7), sacros y caudales, y por el cono medular. Este último es el extremo caudal de la médula espinal, alojado en una dilatación terminal del canal central, conocida como el ventrículo terminal. Las estructuras contiguas componen el filum terminal, estas corresponden a un cordón estrecho del tubo neural (estructura embrionaria que guía la formación de la médula espinal) y al canal central; las mismas unen al cono medular con las vértebras caudales (De Lahunta et al., 2015; Lorenz, Coates y Kent., 2011).

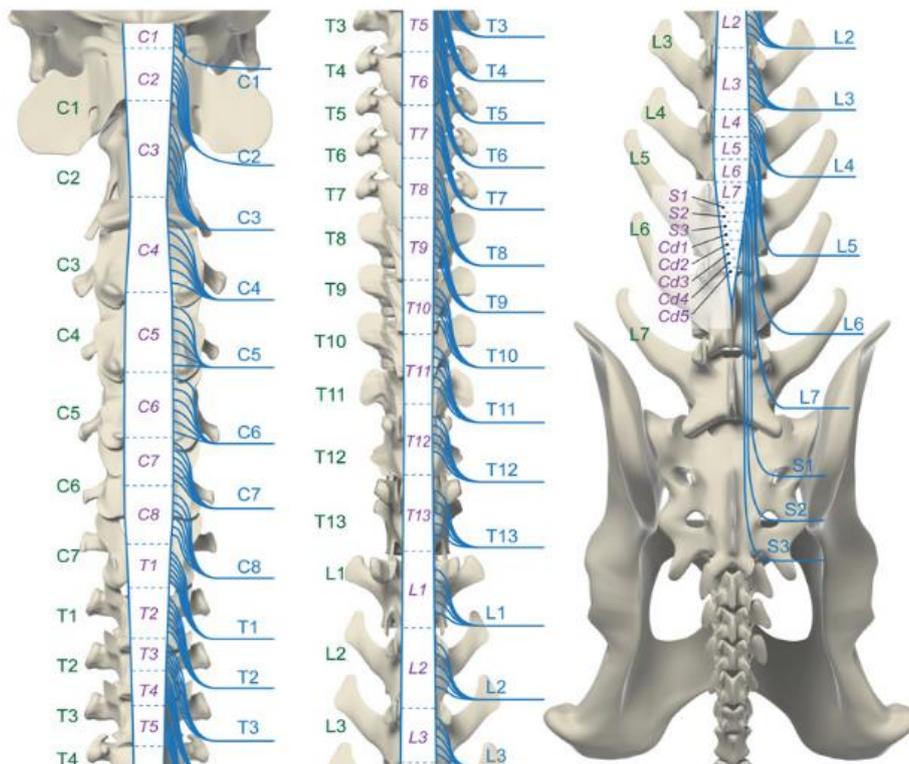


Figura 4. Relaciones anatómicas entre la médula espinal y los segmentos vertebrales en caninos. Extraído de Dewey y Da Costa (2016).

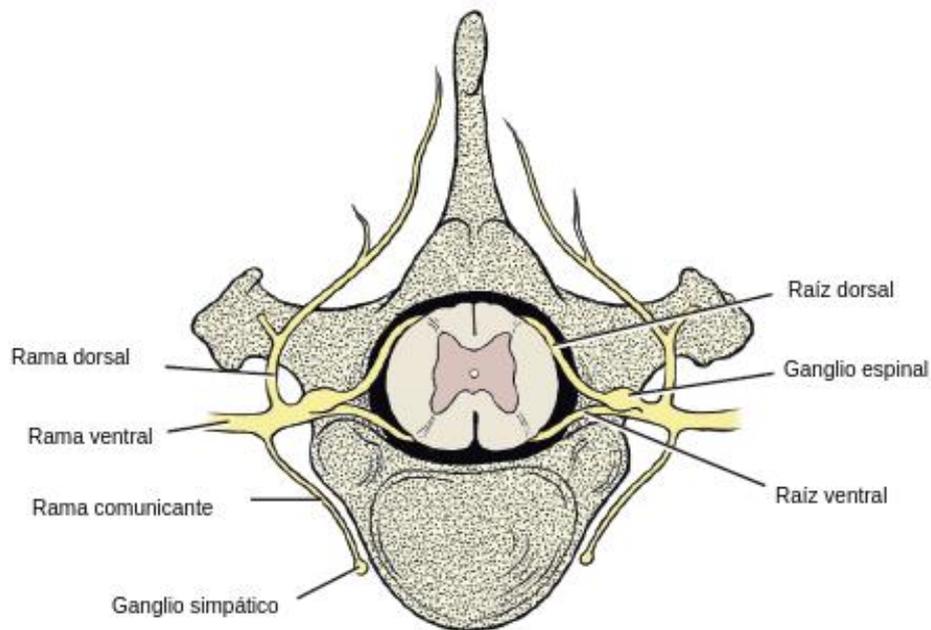


Figura 5. Representación de nervios espinales. Modificado de De Lahunta (2015).

La médula es la encargada de recibir la información sensitiva de los diferentes órganos y conducirla hacia otros sectores del SNC para su procesamiento; asimismo, envía información eferente a músculos y glándulas. A partir de esto, es posible observar que desempeña un papel fundamental en la conducción y modulación de información desde y hacia el encéfalo, el cual recibe la información de tejidos periféricos, y envía comandos a distintos órganos para, por ejemplo, regular la postura, iniciar un movimiento, y mantener la homeostasis de procesos fisiológicos viscerales. La médula espinal, también es considerada un centro reflejo, debido a que en ella se genera la respuesta refleja de músculos y glándulas a estímulos específicos. (Fletcher, 2013; Šulla et al., 2018).

Al corte transversal de la médula espinal, se identifican la sustancia gris dispuesta en forma de H o de mariposa, rodeando al canal central, y la sustancia blanca externa a esta, que contacta con la piamadre. La diferente coloración de estas dos sustancias que se evidencia en las vistas macroscópica y microscópica, se relaciona con sus componentes, en particular, con el contenido de mielina de las mismas.

La sustancia gris está conformada por la mayoría de los somas de células neuronales, células gliales, células del endotelio de capilares y escasos axones mielinizados que se encuentran espaciados. En la misma se distinguen los cuernos dorsales, ventrales y laterales. Los dorsales reciben axones de las raíces dorsales, las que constituyen la vía aferente o sensitiva de la médula. Los cuernos ventrales son aquellos de los cuales emergen las raíces ventrales funcionales en el transporte de señales eferentes o motoras a los órganos periféricos que inervan. Finalmente, los cuernos laterales, presentan un desarrollo variable, pero de gran importancia ya que en donde se ubican los somas neuronales preganglionares del sistema nervioso simpático (Lorenz et al., 2011).

En la sustancia blanca predominan axones mielinizados, aunque también existan axones no mielinizados, y algunas células gliales como oligodendrocitos, astrocitos y células de los vasos sanguíneos que se encuentran en menor densidad que en la sustancia gris (Fletcher, 2013; Lorenz et al., 2011). En la sustancia blanca es posible distinguir tres sectores: dorsal, ventral y lateral. En el sector dorsal, denominado funículo o cordón dorsal, está delimitado por el surco que marca el trayecto de las fibras de la raíz dorsal hacia lateral y el surco mediano dorsal a medial. El funículo ventral abarca la región delimitada por la fisura mediana ventral y el surco ventrolateral, donde se evidencia del trayecto de la raíz ventral. Por último, entre ambas raíces, ventral y dorsal, se ubica el funículo lateral (Lorenz et al., 2011).

Teniendo en cuenta las funciones de cada una de las dos grandes regiones es importante remarcar varios aspectos. En la sustancia gris, las neuronas que cumplen con funciones similares tienden a tener sus cuerpos celulares agrupados esto ha permitido la organización en láminas para su estudio. Las láminas, son columnas longitudinales de células que desarrollan funciones similares. Las mismas pueden extenderse a lo largo de toda la médula o restringirse a ciertos sectores de la misma (Figura 6) (Fletcher, 2013).

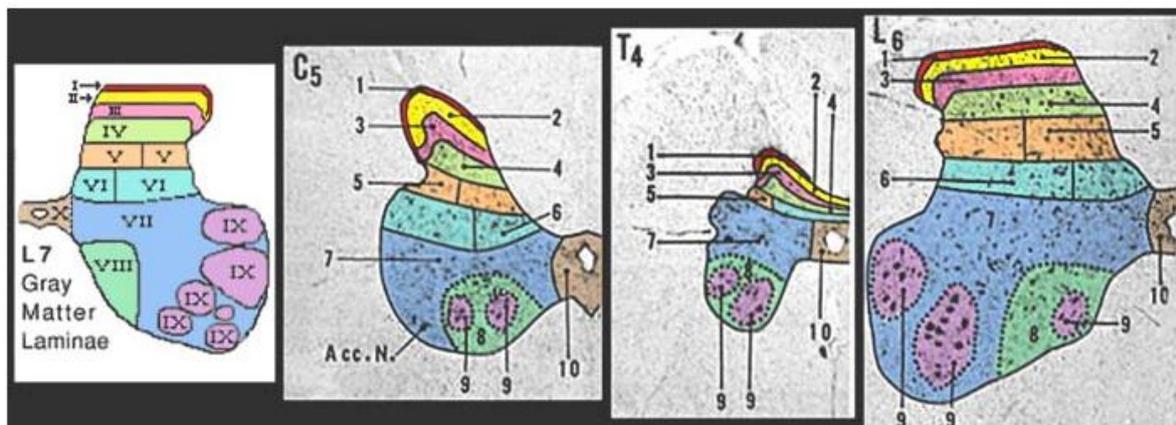


Figura 6. Representación de las láminas y núcleos de la sustancia gris de segmentos medulares: L7, C5, T4, L6 (izquierda a derecha). Extraído de Spinal Cord Anatomy Lab web site, Universidad de Minnesota.

Asimismo, en la sustancia blanca, la organización funcional se dispone en tractos (Fletcher, 2013). Estos tractos axonales son vías de comunicación del SN, siendo posible que tengan dos sentidos. Uno de estos es el ascendente, mediante el cual se realiza un envío de información desde los tejidos periféricos a las diversas regiones del encéfalo, y, el otro es el descendente, donde la transmisión de la información proveniente de la corteza cerebral (vías piramidales) o de otras regiones del encéfalo (vías extrapiramidales) y se dirige a la periferia. La información que recorre la vía ascendente es de tipo sensitiva y la de vía descendente es motora (Figura 7) (Lorenz et al., 2011).

Algunas de estas vías de comunicación entre encéfalo y médula poseen mayor importancia en la clínica neurológica canina (Figura 7). Por ejemplo, los tractos corticoespinales, rubroespinal y retículoespinal que se ubican en el cordón lateral de la sustancia blanca se relacionan con la estimulación de músculos flexores y la inhibición de los extensores de los miembros. Así como el tracto pontino retículoespinal y el vestibuloespinal que realizan las funciones contrarias a los anteriores y están en el cordón ventral. Otros son los tractos sensitivos ascendentes como espinocerebelares, espinomedulares, fascículo cuneatus y fascículo gracilis que son clave en la propiocepción. O los tractos espinotalámico y espinocervicotalámico que transmiten estímulos nociceptivos. En múltiples patologías medulares pueden ser afectados diversos tractos, lo que se traducirá en alteraciones clínicas. Es por ello, que resulta importante tener conocimiento de los mismos y de su disposición en la sustancia blanca. Frente a un daño en la médula espinal, el reconocimiento de alteraciones en el funcionamiento de estos tractos proporciona información acerca la profundidad del daño, y también, puede tener valor pronóstico (Dewey y Da Costa, 2016; Lorenz et al., 2011; Platt, 2010; Šulla et al., 2018).

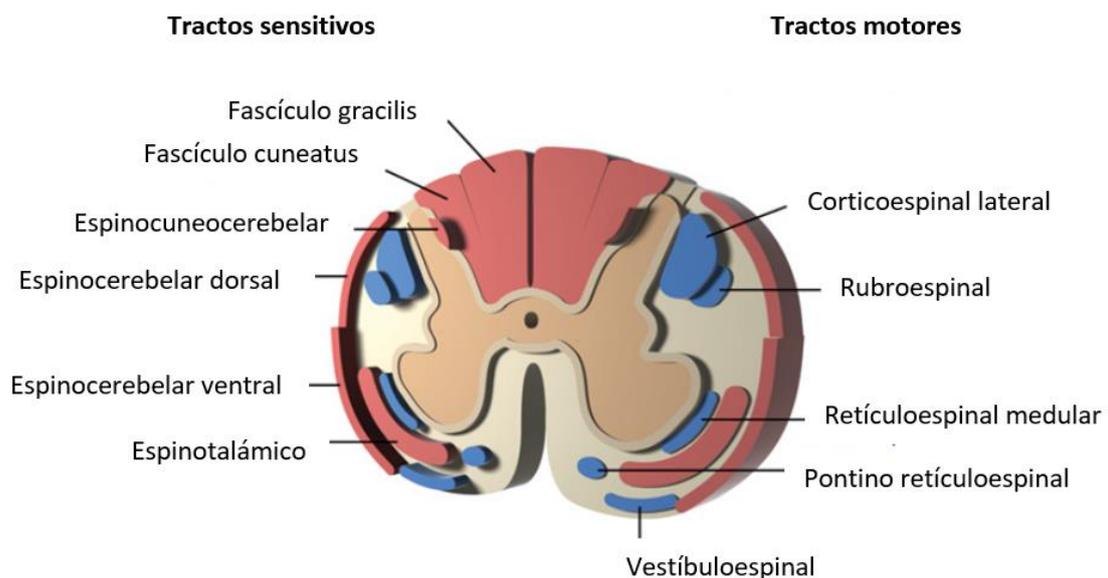


Figura 7. Representación de los tractos medulares sensitivos y motores de más relevancia en la clínica. Modificado de Dewey y Da Costa (2016).

Considerando la funcionalidad del SN, este puede ser organizado en tres grandes grupos, un sector eferente o con funciones motoras, otro aferente o con funciones sensitivas, y un tercero que incluye ambas funciones reconocido como sistema autónomo. La función eferente conduce comandos motores, desde el centro a la periferia, que promueven la función motora, tanto del músculo esquelético de regulación voluntaria o de músculo liso y cardíaco de vísceras, es decir, de regulación involuntaria (sistema autónomo). Por el contrario, la función aferente envía información sensitiva desde la periferia al SNC (Lorenz et al., 2011).

A su vez, el sistema motor o eferente, está formado por dos grupos neuronales principales que reciben el nombre, por su disposición anatómica en humanos, de neurona motora inferior (NMI) y neurona motora superior (NMS). Las NMIs son células neuronales de la región del cuerno ventral de la sustancia gris y de centros motores del tronco encefálico que envían comandos a órganos periféricos. Forman un sistema que está compuesto entonces por células neuronales del cuerno ventral (cuyos somas se organizan en las láminas nombradas anteriormente), la raíz ventral, nervios espinales, nervios periféricos, placa neuromuscular y órgano efector. Estas son las últimas en la cadena de neuronas del sistema efector, ya que contactan directamente con un órgano efector (músculo o glándula). Por otra parte, las NMSs son células que conforman núcleos motores que se localizan en la corteza cerebral (vías de transmisión piramidales); o en el tronco encefálico, núcleo basal y cerebelo (vías extrapiramidales) y que sus axones descienden formando tractos axonales de la sustancia blanca de la médula espinal para comunicarse con interneuronas o, directamente, con las NMIs en la sustancia gris (De Lahunta et al., 2015; Garosi, 2008; Lorenz et al., 2011; Platt, 2010).

La NMS tiene un efecto inhibitorio directo sobre la NMI, y entre ambas, regulan diversas funciones como: el inicio del movimiento voluntario, el mantenimiento del tono muscular para el soporte del cuerpo sobre las fuerzas de gravedad y la regulación de la postura. El conocimiento de estos dos grupos neuronales tiene gran relevancia clínica, ya que el daño de los mismos provoca signos clínicos característicos, permitiendo la neurolocalización de lesiones (Garosi, 2008; Lorenz et al., 2011).

3.2. Neurolocalización de lesiones en la médula espinal

Al estar frente a un caso clínico sospechoso de afección del sistema nervioso, resulta primordial intentar confirmar si el paciente realmente padece una afección neurológica o es otro sistema el involucrado; al igual que, determinar en qué parte del SN se encuentra ubicada la lesión. Esto hace posible el planteamiento de un diagnóstico diferencial de las etiologías que podrían explicar la sintomatología y evaluar la gravedad del proceso patológico. Para esto, es necesario realizar un examen neurológico metódico y completo que permitirá precisar un diagnóstico anatómico de la afección neurológica, dando a conocer la localización y distribución de la lesión dentro del SN (Garosi, 2008).

La evaluación clínica inicia con la valoración del estado mental del animal, la presentación de anormalidades en el estado mental corresponde a alteraciones a nivel del encéfalo, mientras que, si la afección asienta en la médula de forma exclusiva, el estado mental no debería verse afectado. Luego, es importante valorar la postura y posición corporal que tenga el paciente, así como su marcha. Para evaluar la postura, se requiere de la observación de la posición de cabeza, tronco y miembros, en busca de alteraciones. Existen posturas características que son muy útiles para neurolocalizar las lesiones, como por ejemplo la postura de Schiff-Sherrington, en la que los caninos presentan sus cuatro miembros extendidos: los miembros torácicos debido a un aumento en el tono de los músculos extensores simulando una parálisis espástica y, los miembros pelvianos, por parálisis flácida. Estos signos se corresponden con una injuria aguda en la región toracolumbar o lumbar craneal que se extiende a neuronas ascendentes inhibitorias, denominadas "border cells", las cuales se proyectan cranealmente desde la sustancia gris lateral de los segmentos

medulares lumbares craneales para inhibir las neuronas motoras extensoras de los miembros torácicos (Dewey y Da Costa, 2016; Lorenz et al., 2011; Garosi, 2008).

Cuando un paciente presenta una marcha anormal, es imprescindible reconocer su origen, ya que esta puede darse a raíz de una afección de origen traumatológico (lesión que asienta en el aparato locomotor) o neurológico (lesión que asienta en sistema nervioso). Si la etiología se relaciona con este último, es posible que sea explicada por una incapacidad en la coordinación del movimiento (ataxia), en la generación de movimientos voluntarios (paresia/parálisis) o ambas (Lorenz et al., 2011).

Las lesiones medulares suelen afectar la propiocepción. Esta, es definida como la capacidad de percibir las posiciones y movimientos de los músculos y articulaciones (De Lahunta et al., 2015). Para valorar la integridad de los trayectos neuronales responsables de la misma, se evalúan las reacciones posturales a ciertas pruebas: posicionamiento propioceptivo, la prueba del salto, la hemimarcha, entre otras (Dewey y Da Costa, 2016; Lorenz, 2011).

Asimismo, es importante evaluar la presencia de alteraciones en el tono y trefismo muscular, sobre todo de los miembros, así como la respuesta a la estimulación de los arcos reflejos espinales. Habitualmente, los reflejos que se valoran en miembros torácicos son: reflejo flexor o de retirada, reflejo extensor carporradial, bicipital y tricipital. Mientras que en miembros pelvianos se evalúan: reflejo flexor o de retirada, reflejos patelar, tibial craneal y gastrocnemio. Otro reflejo que es observado, con el foco en la evaluación de la integridad de la región caudal de la médula espinal, es el reflejo perineal. La funcionalidad de los esfínteres uretrales y anal también es clave en la evaluación de esta región. Otro reflejo que debe evaluarse para valorar lesiones medulares a nivel toracolumbar es el reflejo cutáneo del tronco, antes conocido como reflejo panicular (Dewey y Da Costa 2016).

En cuanto a la valoración de las vías sensitivas, adicionalmente a las pruebas para la evaluación de la propiocepción, existen maniobras de rutina que permiten orientar al clínico acerca de la percepción, conducción y procesamiento central del dolor. La evaluación de la presencia de percepción del dolor superficial (al pellizcar la piel) y profundo (al aplicar presión sobre una estructura ósea) de los miembros se incluyen en esta línea, así como la palpación de la columna en búsqueda de reacciones de sensibilidad exacerbada (Garosi, 2008).

Tomando en consideración la organización del sistema motor en NMI y NMS, es interesante destacar que la identificación de signos de lesión en NMI hace posible la localización neuroanatómica precisa de, la unión neuromuscular, el nervio periférico, la raíz espinal, o la neurona motora dentro de la médula o tronco encefálico que pueda estar afectada. Esto resulta posible ya que la médula se divide en segmentos (miótomos), que inervan a grupos musculares, y estos pueden ser identificados. Sin embargo, al observar signos clínicos que demuestren afección de la NMS, no es posible localizar de forma precisa en qué región medular o núcleo del tronco encefálico radica la lesión (Garosi, 2008).

En función de las localizaciones y comunicaciones de ambos sistemas de neuronas motoras, comentados anteriormente (NMI y NMS), y teniendo en cuenta las reacciones posturales y reflejos de los cuatro miembros, función de la vejiga, tono de esfínteres anal y uretrales, es posible distinguir cuál de los dos sistemas se encuentra afectado y localizar la afección con mayor o menor precisión. Para esto, considerando

su funcionalidad, la médula se divide en cinco sectores, donde podría suceder una afección. Estos están definidos por las intumescencias cervical y lumbar: encontramos el primero conteniendo segmentos C1 a C5, el siguiente es la intumescencia cervical que abarca C6 a T1, el tercero se extiende desde T2 a L3, el cuarto es la intumescencia lumbar desde L4 a S1 y el último abarca los segmentos medulares desde S1 a S3 o hasta el que corresponda (Figura 8) (De Lahunta et al., 2015; Dewey y Da Costa 2016; Garosi, 2008). Los somas neuronales de la NMI se ubican en las intumescencias, cervical para inervar miembros torácicos y lumbar para inervar miembros pelvianos. Lesiones en estas zonas se visualizan con signos de NMI en los miembros correspondientes (Garosi, 2008).

Dado lo explicado hasta el momento, es posible afirmar que cuando existe una afección que altera grupos de NMI, es probable que los miembros se encuentren con paresia a parálisis, flacidez muscular, reflejos disminuidos o ausentes, y, a su vez, con atrofia muscular de origen neurogénico, la cual usualmente es de aparición temprana. Por el contrario, si la alteración se ubica en lugares de la trayectoria de NMS, es posible que los miembros se encuentren con paresia a parálisis, espasticidad muscular, reflejos normales o aumentados, atrofia muscular adquirida de forma más gradual y menos severa, correspondiente al desuso de los músculos. Por último, el tono muscular suele presentarse normal o aumentado (De Lahunta et al., 2015; Dewey y Da Costa 2016; Garosi, 2008).

En suma, resulta posible que se presenten múltiples situaciones en función de la ubicación de la lesión según se muestra en el Cuadro 1 y Figura 8.

Cuadro 1. Signos clínicos neurológicos por segmento medular afectado.

Sector	Miembros Torácicos	Miembros Pelviano
C1 – C5	Reflejos disminuídos. Signos de NMS Paresia a parálisis	Reflejos normales a aumentados Signos de NMS Paresia a parálisis
C6 – T2	Reflejos disminuídos. Signos de NMI Paresia a parálisis	Reflejos normales a aumentados Signos de NMS Paresia a Parálisis
T3 – L3	Sin particularidades	Reflejos normales a aumentados Signos de NMS Paresia a Parálisis
L4 – S3	Sin particularidades	Reflejos disminuídos Signos de NMI Paresia a Parálisis
S1 a caudal	Sin particularidades	Paresia o paralisis de vejiga, esfínteres uretrales, colon, esfínter anal y cola con SNMI

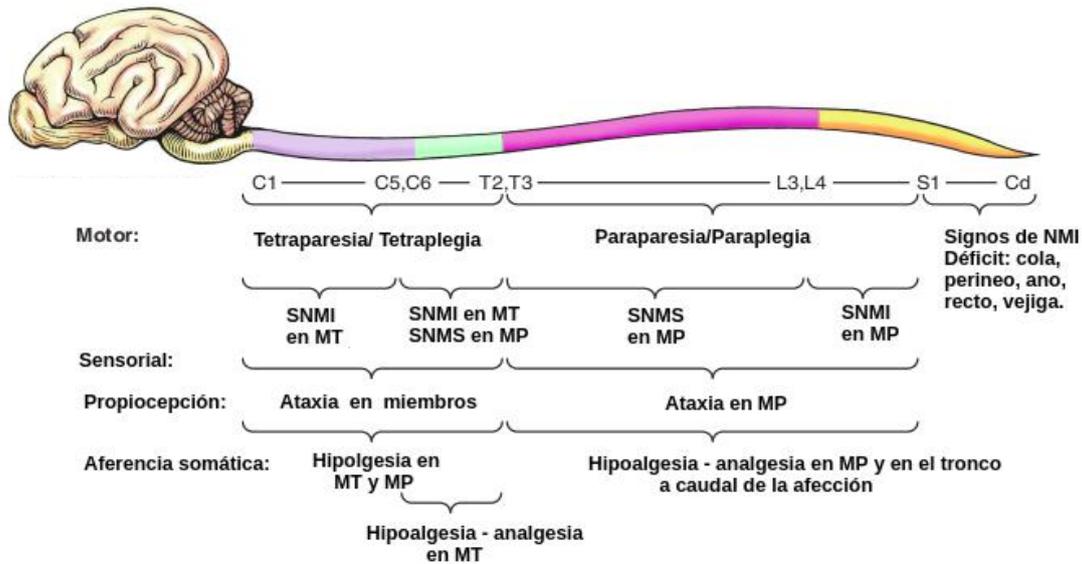


Figura 8. Esquema de signos clínicos neurológicos en función de la localización de la afección medular. SNMS: signos de neurona motora superior, SNMI: signos de neurona motora inferior, MT: miembros torácicos, MP: miembros pelvianos. Modificado de De Lahunta et al. 2015.

3.3. Etiologías de patologías medulares

Una vez realizada la neurolocalización de una afección medular, se plantea un diagnóstico diferencial para luego intentar determinar la etiología. Para esto, las patologías suelen categorizarse de acuerdo a su patogenia utilizando una regla nemotécnica conocida como VITAMIN-D, distinguiéndose las siguientes categorías: vascular, idiopática, traumática o tóxica, anomalía congénita, metabólica, infecciosa y/o inflamatoria, neoplásica y degenerativa (Dewey y Da Costa 2016; Platt 2010).

Dentro de estos grandes grupos es posible encontrar también patologías de origen genético, caracterizadas por la presencia de alteraciones en el genoma de un individuo. Las mismas son causadas por mutaciones patógenas; ya sea, de un gen en particular o de múltiples genes. Estas mutaciones pueden ocurrir en cualquier momento de la vida de un individuo, pero únicamente aquellas que ocurren en el ADN de células germinales pueden ser transmitidas a la descendencia, pudiendo provocar una enfermedad hereditaria (Jackson et al., 2018; Nussbaum et al., 2016). En caninos, una de las enfermedades hereditarias más importantes que afectan la médula espinal es la Mielopatía Degenerativa (Nardone et al., 2016; Neeves y Granger, 2015).

4. MIELOPATÍA DEGENERATIVA.

La Mielopatía Degenerativa (MD) es una enfermedad neurodegenerativa fatal que afecta a caninos adultos. El proceso neurodegenerativo tiene inicio en la región toracolumbar de la médula espinal y se extiende a zonas craneales y caudales de la misma, lo que lleva a un deterioro progresivo de las funciones motoras (Nardone et al., 2016). Clínicamente, es posible evidenciar un proceso insidioso, no doloroso, que se manifiesta con ataxia propioceptiva y paraparesia progresiva, que luego conduce a

paraplejía. En etapas posteriores se aprecian disfunción de esfínteres, gran pérdida de masa muscular y, en estadios finales, la degeneración medular se extiende hacia craneal afectando la inervación de los miembros anteriores pudiendo conducir a una tetraplejía. Comúnmente este cuadro clínico devastador lleva a los propietarios a optar por la eutanasia de los animales afectados. Sin embargo, en aquellos que no son eutanasiados suele ocurrir muerte por asfixia debido a la parálisis de los músculos respiratorios (Coates et al., 2007; Coates, 2014; Dewey y Da Costa, 2016).

La MD afecta principalmente a caninos adultos mayores de 5 años. Se evidencia con más frecuencia en razas de gran porte, en las cuales la edad media de aparición es de 9 años, pero, también puede ocurrir en razas de menor porte, en este caso, con un promedio de edad de inicio de 11 años (Story et al., 2020).

La MD fue descrita por primera vez en la década del 70 por diferentes autores como Averill (1973), Griffiths y Duncan (1975), Braund y Vandeveldt (1978). Ellos definieron rasgos clínicos y patológicos de la enfermedad y encontraron una alta predisposición en el Ovejero Alemán, raza en la que la MD ha sido muy estudiada. De hecho, en sus inicios la enfermedad fue conocida con el nombre de Mielopatía Degenerativa del Ovejero Alemán, pero quedó en desuso ya que la enfermedad fue posteriormente reportada en otras razas así como en caninos mestizos, incluso con una prevalencia más alta (Pellegrino, 2013). Actualmente existe registro de MD en Corgi galés de Pembroke, Bóxer, Rodesiano de Ridgeback, Retriever de Chesapeake, Boyero de Berna, Caniche miniatura y estándar, Pug, Husky Siberiano, Cavalier King Charles Spaniel, Esquimal Americano, Corgi galés de Cardigan, Golden Retriever, Kerry Blue Terrier, Soft Coated Wheaten Terrier, Wirehaired Fox Terrier, Hovawart (OMIA.2022).

El origen etiológico y la fisiopatología de esta enfermedad han sido motivo de investigación y discusión a lo largo de los años y continúan siéndolo en la actualidad, ya que aún no han podido ser completamente dilucidados. Igualmente, desde el 2009, se sostiene que el proceso neurodegenerativo de la médula espinal se relaciona con la presencia de alteraciones estructurales y, en consecuencia, funcionales de la enzima Superóxido Dismutasa 1 (SOD1) (Chang et al., 2019; Crisp, Beckett, Coates, y Miller, 2013; Kimura et al. 2020; Nakamae et al., 2015; Ogawa et al. 2011; Yokota et al., 2018).

4.1. MD y Esclerosis Lateral Amiotrófica

La MD ha cobrado mucha importancia a nivel de investigación básica y preclínica en medicina humana debido a que presenta muchas similitudes con la Esclerosis Lateral Amiotrófica (ELA) (Story et al., 2020).

La ELA es una patología devastadora que se caracteriza por una neurodegeneración espinal y cerebral progresiva de las vías motoras superiores e inferiores. El 90% de los casos de ELA son conocidos como “esporádicos” ya que no presentan un componente hereditario aparente; mientras que el 10% sí lo presentan; dentro de este último grupo, existe un subgrupo que se asocia con más de 100 mutaciones puntuales en el gen que codifica para la SOD1. Para el estudio de esta forma de ELA, se han desarrollado modelos transgénicos en roedores donde la sobreexpresión de diferentes mutaciones permite reproducir el fenotipo de ELA en animales adultos (Ibarburu, 2017). Sin embargo, estos no son modelos naturales y no

siempre logran reproducir todas las características de la enfermedad. Por lo tanto, a partir del descubrimiento de las mutaciones de SOD1 en caninos con MD esta especie se ha posicionado como un interesante modelo natural para el estudio de ELA (Nardone et al., 2016; Neeves y Granger, 2015; Story et al., 2020).

4.2. Fisiopatología de MD

En caninos solo ha sido reportada la forma hereditaria de MD y hasta el momento han sido distinguidas dos mutaciones en el gen SOD1, que codifica para la enzima superóxido dismutasa 1 (Awano et al., 2009; Kobatake et al., 2017; Wininger et al., 2011). La primera es una transición de guanina a adenina en el nucleótido 118 del exón 2 (SOD1: c.118G > A) mientras que la segunda es un cambio de adenina por timina en el nucleótido 52 (SOD1: c.52A > T) del exón 1 del gen (Wininger et al., 2011).

La mutación SOD1: c.118G > A produce una sustitución de glutamato por lisina en el aminoácido 40 (E40K) de la proteína codificada, fue la primera en ser identificada y es la que ha presentado mayor distribución en caninos (Awano et al., 2009; Zeng et al., 2014). La segunda mutación (SOD1: c.52A > T) causa la sustitución de serina por treonina en el aminoácido 18 de la secuencia de SOD1, y es exclusiva de la raza Boyero de Berna (Wininger et al., 2011).

En función de la identificación de individuos homocigotas para la primera mutación (SOD1: c.118G > A) que no manifestaban la enfermedad (Awano et al., 2009) se considera que la MD presenta un modo de herencia autosómico recesivo con penetrancia incompleta (Awano et al., 2009; Kimura et al., 2020). Existen escasos reportes de individuos heterocigotos que presentaron hallazgos histopatológicos sugerentes a estadios tempranos de la enfermedad (Kimura et al., 2020).

En el año 2016, Ivansson et al. (2016) detectaron un locus modificador dentro del gen que codifica para la proteína de cuerpo nuclear SP110 en el cromosoma 25, en perros de la raza Corgi galés de Pembroke con diagnóstico confirmado de MD que presentaban homocigosis recesiva para la mutación de la SOD1, anteriormente nombrada. Este locus estaría asociado a una mayor probabilidad de desarrollar la enfermedad y a un inicio prematuro de la misma en caninos homocigotas recesivos para la SOD1.

La proteína SP110 es parte de un grupo de proteínas de cuerpos nucleares que contribuyen con la transcripción de genes especialmente asociados a la respuesta inmunológica. Se plantea que la participación de esta proteína alterada, en la patogenia de la MD, podría guardar relación con la neuroinflamación local evidenciada en los animales enfermos, en la que intervienen células de la microglía, neuronas y células T (Ivansson et al., 2016).

Hasta el momento, la presencia del locus modificador asociada al efecto en MD sólo ha sido identificada en una población de perros de la raza Corgi galés de Pembroke. En estos perros, la presencia de un solo alelo con la mutación ya aumenta la susceptibilidad a la enfermedad, por lo que actúa en dominancia. Adicionalmente, este haplotipo ha presentado una amplia distribución en caninos de raza bóxer; esto puede ser congruente con la gran predisposición racial que poseen o con que existan otros loci actuando como modificadores que deban ser identificados (Ivansson et al., 2016). Sin embargo, en un estudio reciente donde se reportaron casos de MD en caninos de raza Howavart, homocigotas para la mutación SOD1:c.118G>A, no se

encontró asociada a la proteína SP110 (Mandrioli et al., 2021). Evidentemente, este es un campo en el que se deben profundizar estudios en el futuro.

Actualmente, se continúan investigando y detallando nuevos fenómenos celulares y moleculares ligados a la fisiopatología de la enfermedad (Neeves y Granger, 2015) que se exponen a continuación.

4.3. Rol de la SOD 1 mutada: nueva función tóxica

En caninos sanos, la SOD1 es uno de los principales homodímeros encargados de la conversión de radicales superóxidos a peróxido de hidrógeno y oxígeno. Está localizada en el citoplasma, núcleo, espacio intermembrana mitocondrial, lisosomas y peroxisomas, y resulta de gran importancia para la homeostasis oxidativa celular del sistema nervioso (Castillo, Riverón y Li, 2014).

El tejido nervioso es sumamente sensible al estrés oxidativo, debido a que posee bajas concentraciones de enzimas antioxidantes, alto contenido de sustratos oxidables y una gran producción de especies reactivas del oxígeno en su fisiología habitual (Cassano et al., 2020). Cuando el equilibrio celular oxidativo se encuentra afectado, componentes estructurales como lípidos, proteínas y ácidos nucleicos se ven amenazados, y se pueden activar vías que estimulen la apoptosis celular. La incapacidad de mantener la homeostasis a nivel oxidativo en el sistema nervioso es común en varias enfermedades neurodegenerativas, aunque posean diferentes procesos fisiopatológicos implicados (Awano et al., 2009; Cassano et al., 2020).

Adicionalmente, la excitotoxicidad se distingue como otro proceso relevante en el daño neurodegenerativo de personas que padecen ELA. Se trata de un proceso patológico por el cual las neuronas son dañadas por la sobreactivación de receptores de glutamato (el neurotransmisor excitatorio más importante en mamíferos) lo que provoca una entrada masiva de calcio a las mismas (Ogawa et al., 2014). Ogawa et al. (2014) obtuvieron resultados que ofrecen evidencia acerca del alcance de estos procesos en caninos. Ellos estudiaron cuernos ventrales de la médula espinal de caninos que poseían la mutación para SOD1 observando signos de pérdida neuronal, así como una disminución significativa del transportador de glutamato 1 (GLT-1) encargado de realizar la recaptación de dicho neurotransmisor.

En la MD, se considera que las alteraciones estructurales de la SOD1 conducen a la agregación intracitoplasmática de formaciones proteicas aberrantes de la propia SOD1 en neuronas y células gliales. A su vez, esto desencadenaría una serie de respuestas celulares secundarias que contribuirían con el proceso degenerativo. Sin embargo, hay varios aspectos fisiopatológicos que aún se encuentran bajo investigación (Chang et al., 2019).

Crisp et al. (2013), estudiaron las características bioquímicas de la SOD1 en caninos con MD y concluyeron que el daño neurodegenerativo no ocurre únicamente por la pérdida funcional de la SOD1, si no que la enzima en su conformación alterada desempeña una función tóxica, del mismo modo que ocurre en la ELA.

Esta función tóxica sucede debido a un cambio en las fuerzas de repulsión intermoleculares por parte de la enzima, que, específicamente, promueve la producción de oligómeros unidos por puentes disulfuro (Kimura et al., 2020). Esto finalmente se traduce en la formación de agregados detergentes insolubles en el

citoplasma de motoneuronas y células gliales (Chang et al., 2019; Crisp et al., 2013; Nakamae et al., 2015; Yokota et al., 2018). A partir de que sucede la acumulación de estos agregados intracitoplasmáticos se desencadena el llamado estrés del Retículo endoplasmático (RE), que a su vez produce la inducción de la “Respuesta a Proteínas mal Plegadas” (Chang et al., 2019).

4.4. Estrés del RE

El RE es un organelo de gran importancia en las células y está encargado de la síntesis y plegamiento proteico, síntesis lipídica, almacenamiento de calcio entre otras funciones. El proceso de plegamiento proteico es realizado mediante la asistencia de enzimas denominadas chaperonas, siendo las más importantes la proteína disulfuro isomerasa (PDI) y la oxidasa de RE-1 (ERO1) (Yokota et al., 2018).

Este organelo es particularmente sensible a cambios en el microambiente celular que pueden resultar en estrés y mal funcionamiento del mismo conduciendo a fallas en la síntesis y plegamiento proteico. El estrés del RE ha estado implicado en varias enfermedades neurodegenerativas (Yokota et al., 2018).

La respuesta celular al estrés del RE consiste en la “Respuesta a Proteínas mal plegadas” (Unfolded Protein Response en inglés), la misma es activada en animales sanos para mantener la homeostasis celular, corrigiendo el plegamiento y síntesis proteica (Schönthal, 2012).

Durante esta respuesta de estrés del RE ocurre una activación de la proteína BiP que une inmunoglobulinas (BiP- Immunoglobulin-binding protein, en inglés). A su vez, sobreviene una producción exagerada de las enzimas chaperonas principalmente de PDI (Chang et al., 2019). Todos estos procesos si bien en tienen un fin protector en un inicio, su activación de forma prolongada conduce a la activación de procesos pro-apoptóticos, llevando por tanto a la muerte celular (Schönthal 2012). En 2019 Chang et al., demostraron la co-localización de la PDI con la SOD1 mutada en motoneuronas de caninos con MD, de la misma forma que ocurre en humanos y en modelos roedores de ELA (Chang et al. 2019). El estrés del RE no solamente ocurre en neuronas, si no también, en células de la neuroglía como microglía y astrocitos (Schönthal, 2012).

4.5. Rol de las células gliales en la MD

Al considerar el papel clave que cumplen las células gliales en el soporte de las neuronas, resulta imposible asumir que no sufrirán cambios en esta patología.

Como fue mencionado anteriormente, las células de la neuroglía también sufren frente al estrés del RE. Esto fue demostrado por Yokota et al. (2018) quienes observaron una activación de la respuesta de estrés del RE en la microglía. Para esto, utilizaron un marcador para la captación de GRP78/BiP en segmentos de médulas espinales de caninos con MD. Los autores hallaron grandes concentraciones de BiP positivas en la microglía de la sustancia blanca, que carecía de agregación intracitoplasmática de SOD1 y, dado que la microglía forma parte de la respuesta inmune en el sistema nervioso, los autores sugieren que el estrés del RE de la microglía podría aumentar la inflamación en la médula espinal de perros con MD (Yokota et al., 2018). Por otra parte, la respuesta inflamatoria del tejido nervioso en ciertas condiciones puede hacerse crónica y promover la neurodegeneración local (Ibarburu, 2017).

Adicionalmente, se ha observado una disminución de la expresión de genes asociados a la mielina y al suministro energético a las neuronas motoras; que también parece estar ligado al proceso degenerativo (Golubczyk et al., 2019; Yokota et al., 2018).

Por otro lado, se ha visualizado hipertrofia de astrocitos evidenciándose desarrollo de estrés oxidativo en etapas tempranas de la enfermedad, pero no en etapas avanzadas, a diferencia de lo que sucede con la microglía. Es por esto por lo que Yokota et al. (2018) apoyan la teoría de que los astrocitos cumplen un papel importante en la neuroinflamación temprana, como iniciadores inflamatorios en respuesta a la acumulación de SOD1 mutada en estas etapas.

4.6. Signos clínicos de MD

El examen clínico neurológico es fundamental para la obtención de un diagnóstico presuntivo. En el cuadro clínico inicial, el paciente afectado presenta ataxia propioceptiva y paresia de miembros pelvianos (figura 9 A), que pueden ser asimétricas, con reflejos espinales normales. Este cuadro progresa a afección de NMI de miembros pelvianos, y más adelante, se continúan afectando miembros torácicos (figura 9 B), esfínteres anal y urinarios y, por último, los músculos respiratorios, conduciendo a la muerte del animal (Coates et al., 2007; Morgan, Coates, Johnson, Shelton y Katz, 2014; Neeves y Granger, 2015; Shelton et al., 2012). Generalmente sucede una paraparesia no ambulatoria que se vuelve determinante en la elección de eutanasia por parte de los propietarios. En razas de gran porte se ha estimado que sucede a los 6 a 9 meses de la aparición de los síntomas (Neeves y Granger, 2015).

La falta de hiperestesia paraespinal es un signo muy relevante para poder diferenciar este proceso de otros que, de una forma u otra, causen una compresión medular (Coates y Winger, 2010). Debido a los cambios que ocurren en los signos clínicos durante el transcurso de la enfermedad, el curso clínico de la MD ha sido dividido en cuatro diferentes estadios, los cuales están representados en la Cuadro 2.

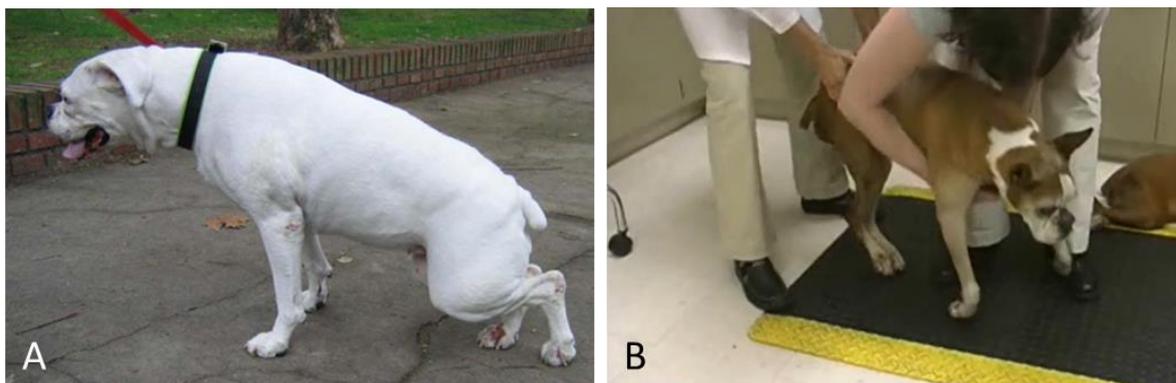


Figura 9. A) Canino macho con Mielopatía degenerativa (MD). Paraparesia y ataxia moderada. Obsérvese debilidad en tren posterior y lesiones en dedos de miembros pelvianos. Extraído de Suraniti, et al. 2011. B) Fotograma de canino en etapa avanzada de MD, cuadruplejía. Extraído de Coates, 2019.

Cuadro 2. Signos clínicos de MD en las distintas etapas establecidas de acuerdo al progreso de la enfermedad.

ETAPA DE MD	SIGNOS CLÍNICOS
6 – 12 meses	<p>Paraparesia con signos de NMS y ataxia propioceptiva:</p> <ul style="list-style-type: none"> ▪ ataxia propioceptiva general y progresiva ▪ déficit en reacciones posturales de miembros pelvianos ▪ reflejos espinales intactos (patelar puede estar disminuido) ▪ escasa hiperestesia paraespinal
9 – 18 meses	<p>Paraparesia con signos de NMI a paraplejia:</p> <ul style="list-style-type: none"> ▪ pérdida media a moderada de masa muscular en miembros pelvianos ▪ ausencia o disminución de reflejos espinales de miembros pelvianos ▪ paraparesia no ambulatoria a paraplejia ▪ +/- incontinencia fecal y urinaria
14 – 24 meses miembros torácicos:	<p>Paraparesia con signos de NMI a debilidad en</p> <ul style="list-style-type: none"> ▪ signos de debilidad en miembros anteriores ▪ paraplejia flácida ▪ ausencia de reflejos espinales en miembros pelvianos ▪ pérdida severa de masa muscular en miembros pelvianos ▪ incontinencia fecal y urinaria
Etapa final (>36)	<p>Tetraplejia con signos de MNI y signos de afección tronco-encefálica:</p> <ul style="list-style-type: none"> ▪ tetraplejia flácida ▪ dificultad para tragar y con la movilidad de la lengua ▪ ausencia de reflejos espinales en los cuatro miembros ▪ reflejo del panículo cutáneo disminuido o ausente ▪ pérdida general y severa de masa muscular ▪ incontinencia fecal y urinaria

Tomado de Coates y Wininger, 2010.

4.7. Diagnóstico de MD

En Medicina Veterinaria todavía no se cuenta con pruebas diagnósticas que confirmen de forma definitiva el diagnóstico antemortem de MD. Hasta el momento la evaluación histopatológica postmortem de los tejidos medulares es la única vía para su confirmación (Neeves y Granger 2015). Sin embargo, se cuenta con múltiples herramientas que pueden colaborar en la orientación de un diagnóstico presuntivo y, adicionalmente, se están investigando nuevas técnicas con el mismo fin.

El diagnóstico presuntivo se basa en la reseña, anamnesis, historia clínica, sintomatología y mediante el descarte de otras patologías que cursan con signos similares. Además, resulta útil realizar pruebas genéticas para determinar si el paciente es portador de una de las mutaciones en el gen de la SOD1 (Lewis et al., 2021; Neeves y Granger 2015). Sin embargo, es importante recordar que la presencia de dos alelos de las mutaciones reconocidas no garantiza que los animales estén enfermos o que vayan a desarrollar la enfermedad en el futuro. Desafortunadamente, esta enfermedad no presenta lesiones características visibles en técnicas de imagen avanzada o cambios específicos en el LCR (Johnson et al., 2021; Story et al., 2020).

4.8. Diagnóstico diferencial

Para el diagnóstico diferencial se deben considerar diversas afecciones, en primer lugar, otras causas de mielopatías, pero también patologías ortopédicas que puedan presentar signos similares, tales como la displasia de cadera, ruptura de ligamentos cruzados, enfermedad degenerativa articular, e incluso patologías abdominales caudales como enfermedad prostática o hernia perineal (Coates y Wininger, 2010; Pellegrino, 2013). Dentro de las patologías que de forma primaria o secundaria afectan la integridad y función de la médula espinal encontramos, enfermedades inflamatorias que pueden ser de origen inmunomediado o infeccioso, neoplasias primarias como por ejemplo meningiomas, linfomas, gliomas, o metástasis de tumores localizados en otra región del organismo. Incluso, neoplasias de tejidos subyacentes como sarcoma de tejidos blandos u osteosarcoma. Además, enfermedad del disco intervertebral, principalmente protrusión del disco intervertebral (o Hansen tipo II) debido a su inicio insidioso y su curso crónico. Otras compresiones medulares crónicas como por ejemplo debidas a hipertrofia de ligamentos o espondilosis de facetas articulares (Neeves y Granger, 2015; Pellegrino, 2013).

4.9. Diagnóstico confirmatorio: histopatología

Actualmente, el diagnóstico definitivo puede realizarse únicamente post-mortem mediante el hallazgo de lesiones histopatológicas características en la médula espinal de animales enfermos. Estas son, la presencia de degeneración axonal y la desmielinización de la sustancia blanca principalmente en el funículo lateral y dorsal de los segmentos torácicos medios a caudales (figura 10 A). Otras lesiones evidenciadas son: astrocitosis moderada a severa, cromatolisis y disminución en el número de neuronas motoras (sobre todo en el cuerno ventral de segmentos torácicos), así como afección de unidades motoras (neuropatía periférica) en estadios avanzados de la enfermedad. Por último, a nivel muscular, es posible evidenciar

atrofia en músculos intercostales y de los miembros, la cual ocurre debido a la denervación (atrofia neurogénica) (Nardone et al., 2016; Neeves y Granger, 2015; Pellegrino, 2013).

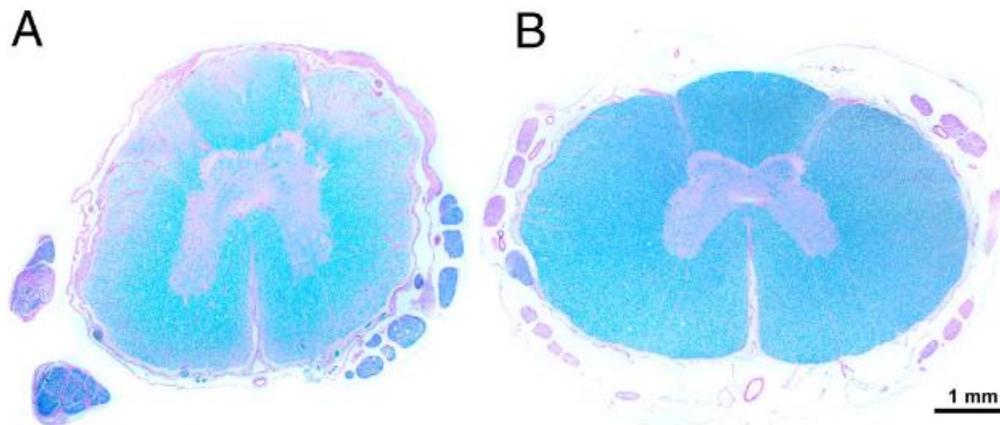


Figura 10. Cortes histológicos de segmentos medulares torácicos, teñidos con Luxol Fast Blue combinada con Periodic Acid-Schiff, de canino con MD (A) y canino sano (B). En A se observan zonas pálidas en la sustancia blanca correspondientes al proceso neurodegenerativo. Extraído de Awano, et al. (2009).

4.10. Pruebas disponibles para genotipado del gen SOD1

En la actualidad, se encuentran disponibles test genéticos para la detección de las mutaciones SOD1: c.118G>A y SOD1: c.52A > T tanto en homocigosis como en heterocigosis. La presencia de homocigosis para SOD1: c.118G>A en caninos de las razas nombradas anteriormente o razas mixtas, o para SOD1: c.52A > T en perros Boyero de Berna tiene gran significancia en el diagnóstico presuntivo de la enfermedad (Boeykens, Peelman, Bhatti y Broeckx, 2020; Neeves y Granger 2015; Story et al., 2020).

Investigadores como Capucchio et al. (2014) y Chang et al. (2013) han estudiado diversas modalidades de PCR para la detección de la mutación c.118G>A para la SOD1, obteniendo muy buenos resultados. Esta prueba diagnóstica, y sus variedades, se centran en la amplificación de determinada secuencia de ADN mediante la acción de enzimas ADN Polimerasas. Dentro de las modalidades desarrolladas, varias han sido utilizadas en investigaciones con fines diagnósticos en MD, como PCR convencional, PCR en tiempo real, prueba de minisequenciación y de secuenciación de ADN (Capucchio et al., 2014; Chang et al. 2013; Holder, Price, Adams, Volk y Catchpole, 2014; Zeiler, Van der Zwan y Oosthuizen, 2013).

La PCR convencional y el posterior RFLP (polimorfismo en el largo de los fragmentos de restricción) se ha utilizado en múltiples estudios de prevalencia (Ayala et al., 2018; Holder et al., 2014; Zeng et al., 2014; Zeiler et al., 2014). La técnica de PCR permite amplificar a gran escala el fragmento de ADN que contiene la mutación de interés. Por otra parte, la técnica de RFLP utiliza la enzima de restricción *AclI* (CTGAAG) que no corta al fragmento amplificado cuando la mutación no está presente (CTAAAG) y lo cortan cuando la misma si lo está (Holder et al., 2014).

En el estudio de Chang et al. (2013) se comparó la utilidad del PCR + RFLP, con la PCR a tiempo real utilizando sondas alelo específicas. La gran diferencia descrita es que la PCR a tiempo real amplifica un fragmento del cual se obtienen los tres genotipos posibles sin necesidad de utilizar enzimas de restricción ni de electroforesis en geles de agarosa. Como desventaja adicional del PCR + RFLP, Chang et al. (2013) encontraron dificultades en la digestión de todos los fragmentos, al igual que estudios más recientes (figura 11) (Santos et al., 2020).

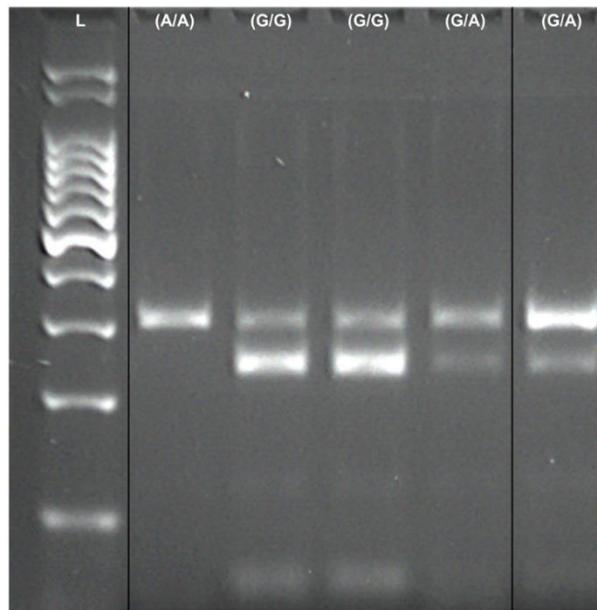


Figura 11. Patrones electroforéticos para la mutación SOD1:c.118G > A en “Molecular screening for the mutation associated with canine degenerative myelopathy (SOD1:c.118G > A) in German Shepherd dogs in Brazil”. Extraído de Santos et al. (2020).

La secuenciación es una técnica que permite conocer el orden de nucleótidos de una muestra de ADN (Márquez et al., 2014; Zeiler et al., 2014). La misma es utilizada como técnica diagnóstica para las mutaciones de MD, así como para corroborar resultados obtenidos por las otras técnicas (Zeiler et al., 2014). Su gran desventaja es que es una prueba que insume altos costos de reactivos y equipamiento (Márquez et al., 2014; Zeiler et al., 2014). Aunque existen laboratorios, a nivel nacional (Genexa) e internacional que reciben muestras de ADN para su procesamiento y secuenciación.

En los últimos años se han desarrollado técnicas de genotipado más complejas como la minisequenciación que permiten alcanzar niveles de sensibilidad, de especificidad, y costos muy similares a los detectados en el real time PCR. Adicionalmente, da la posibilidad de analizar varios sectores a la vez, si se quisieran buscar otras mutaciones, como la identificada en el Boyero de Berna. Sin embargo, la necesidad de contar con un secuenciador automático limita la utilidad de la técnica, ya que no todos los laboratorios de diagnóstico cuentan con ese equipo (Capucchio et al. 2014).

Las pruebas de genotipado permiten detectar si un individuo es portador en homocigosis o heterocigosis de la mutación. La ausencia de la mutación en ambos alelos descarta que el animal padezca la enfermedad, sin embargo, debido a la característica de penetrancia incompleta, la presencia de homocigosis para la mutación no confirma el diagnóstico de MD, ni asegura que el animal vaya a desarrollar la enfermedad en el futuro y, por lo tanto, se requieren otras herramientas que ayuden a establecer el diagnóstico presuntivo de MD (Awano et al., 2009; Ivansson, 2016). A su vez, debe tenerse en cuenta que la heterocigosis (presencia de un solo alelo con la mutación) no descarta que el canino esté cursando la enfermedad o, sea libre de manifestarla (Zeng et al., 2014).

La información del genotipo permite seleccionar reproductores libres de la mutación (Neeves y Granger, 2015; Zeng et al., 2014). Sin embargo, es relevante comentar que la gran prevalencia de la mutación en razas como Bóxer y Corgi galés, es un aspecto que desestimula la eliminación estricta de la misma ya que podría disminuir de forma notoria el tamaño efectivo de estas poblaciones y la diversidad genética en estas (Awano et al., 2009; Boeykens et al., 2020). Por lo que un consejo para la cría de razas más adecuado, con la realidad de las poblaciones, podría ser que se apunte a apareamientos selectivos para el mejoramiento genético, sin disminuir tan drásticamente la diversidad genética (Boeykens et al., 2020).

4.11. Búsqueda de biomarcadores de MD

En las últimas décadas, se ha intentado caracterizar biomarcadores que puedan colaborar en el diagnóstico de la enfermedad. Se considera un marcador diagnóstico ideal aquel que es confiable, sensible sobre todo en fases tempranas de las patologías, es no invasivo, y requiere bajos costos para su desarrollo e implementación (Cloutier, Marrero, O'Connell y Morin, 2015; Nakata et al., 2019; Panek et al., 2020).

4.11.a. Detección de miARNs

Los micro ARNs o miARNs son moléculas cortas (20 – 25 nucleótidos) de ARN no codificantes conservadas evolutivamente. Si bien no se encargan de la síntesis proteica, están involucrados en la regulación de la expresión génica a nivel post-transcripcional (Marioni, Zaho, Amengual-Batle, Rzechorzek y Clinton, 2018). Para eso, se unen a secuencias complementarias de ARN mensajero y usualmente generan una inhibición o silenciamiento de la translación (Bartel, 2009; Vansteenkiste, Fenger, Fadda, Martin y da Costa., 2019).

En muchas especies (incluidos el hombre y los caninos), se han identificado diferentes perfiles de expresión de miARN en diversos tejidos y fluidos corporales, como orina, LCR, suero y plasma, en los que permanecen encapsulados en microvesículas en concentraciones muy estables (Nakata et al., 2019; Vansteenkiste et al., 2019). Estos se han detectado en asociación a procesos celulares normales, pero también a diversas enfermedades tales como cáncer, enfermedades autoinmunes, cardiovasculares o metabólicas y en patologías que afectan el SNC (Meza, Valle, Pedraza y Pérez, 2012).

En medicina humana, se han propuesto como posibles biomarcadores para el diagnóstico y monitorización varias enfermedades neurodegenerativas, tales como Alzheimer, Huntington, Parkinson y ELA; ya que han sido asociados a diferentes procesos fisiológicos dentro de la homeostasis celular del sistema nervioso (Cloutier et al., 2015; Nakata et al., 2019; Vansteenkiste et al., 2019).

Existen pocos estudios que hayan evaluado la potencialidad de los miARNs como biomarcadores de patologías del SNC en caninos (Gaitero, Russell, Monteith y LaMarre, 2016; Marioni et al., 2018; Vansteenkiste et al., 2019). Una investigación reciente realizada por Nakata et al. (2019), identificó al miR-26b como un potencial marcador de MD en el Welsh Corgi. El mismo fue detectado en mayores concentraciones plasmáticas en caninos con MD (homocigotas para la mutación c.118G > A, con sintomatología clínica) en comparación con caninos sanos y caninos que padecían enfermedad de disco intervertebral (diferencial de MD). Este miARN se encuentra ligado a vías metabólicas que son activadas cuando se manifiesta la mutación en SOD1 e implican la expresión de proteínas de fase aguda. A partir de estos resultados, ellos sugieren que la medición de miR – 26b puede ser considerada como una opción prometedora para contribuir al diagnóstico y monitoreo de MD, resaltando que su detección se realiza de forma no invasiva, y parece tener una alta especificidad en este estudio, donde los autores evaluaron muestras de caninos con DM, enfermedad de degenerativa de disco intervertebral y sanos. Sin embargo, se ha visto que la sensibilidad de los miARN puede ser baja cuando se encuentran en escasas concentraciones en fluidos corporales. Esto fue reflejado en los resultados para miR-26b. Se requiere mayor evidencia científica acerca de la expresión de los miARNs, sobre todo de miR -26b, en caninos en distintas situaciones fisiológicas y patológicas (Nakata et al., 2019).

4.11.b. Detección de neurofilamentos fosforilados.

Otros candidatos a officar como biomarcadores en pacientes con MD son los neurofilamentos fosforilados (NF). Estos, constituyen el citoesqueleto de los axones en diversas especies, incluídas humana y canina. Resultan esenciales en la neurogénesis, el crecimiento radial del axón, su mantenimiento posterior y en la conducción axonal. Hay cuatro subunidades de NF en el SNC: la de cadena pesada, liviana, intermedia y la alfa internexina, la cual es sustituida por periferina en el SNP (Panek et al., 2020; Yan, Jensen y Brown, 2007). Cuando hay un daño en axones o degeneración neuronal, las subunidades son liberadas en el LCR. En caninos se han podido detectar incremento de neurofilamentos fosforilados en LCR y plasma en algunas enfermedades neurodegenerativas, incluyendo la MD y se considera que podrían aportar información relevante para el diagnóstico y estadificación de las mismas (Olby et al., 2019; Panek et al., 2020; Toedebusch et al., 2017).

En lo que respecta a la MD, se han realizado dos estudios que miden concentraciones de NF con diferentes técnicas en caninos con MD. En una de las investigaciones, Toedebusch et al. (2017) utilizaron la técnica ELISA para detectar niveles de NF de cadena pesada en suero y LCR de varios grupos de caninos para compararlos. Los caninos que fueron estudiados eran 53 con diagnóstico definitivo de MD agrupados según estadio clínico, 27 caninos control agrupados en caninos sanos (sin patologías neurológicas similares) dividido según edades y 7 caninos de riesgo (caninos sanos con homocigosis para la mutación). Adicionalmente, para evaluar la especificidad de esta prueba se contó con un grupo de 12 caninos que eran mayores

a 8 años y padecían enfermedad de degenerativa de disco Hansen tipo 2 a nivel toracolumbar. Los autores observaron que las concentraciones de NF de cadena pesada aumentan en caninos con MD en LCR, pero no notaron alteraciones en suero (Toedebusch et al 2017). A partir de los resultados plantean que al igual que sucede con ELA, no es posible correlacionar las concentraciones de NFs de cadena pesada en LCR con el estadio de la enfermedad. También sugieren que de acuerdo a los niveles de NF de cadena pesada detectados en LCR era posible distinguir una axonopatía degenerativa de un trastorno compresivo y crónico de la médula espinal. Sin embargo, los autores indican que la población utilizada para realizar esta comparación es muy pequeña, y que esta no es una observación estadísticamente confiable. Por lo tanto, se requiere de futuros estudios que abarquen mayor cantidad de animales y más axonopatías.

Por otro lado, Panek et al. (2020) se dedicaron a medir las concentraciones de NFs de cadena liviana en plasma en caninos sanos, caninos con DM y caninos con síndrome de disfunción cognitiva. Estos autores utilizaron la técnica de inmunoensayo SIMOA (single-molecule array immunoassay), que permite detectar concentraciones de NFs más bajas que en la técnica empleada por Toedebusch et al. (2017). Los investigadores demostraron que los niveles de NFs de cadena liviana en plasma aumentan con la edad y que existe un aumento significativo en aquellos que padecen las enfermedades neurodegenerativas evaluadas. Desafortunadamente, no observaron diferencias entre los valores de NFs en perros con MD y síndrome de disfunción cognitiva, por lo tanto, si bien estos NFs parecen ser buenos marcadores de neurodegeneración, no son específicos para una enfermedad. De todas formas, el uso de estos biomarcadores en conjunto con la evaluación clínica podría ser de gran ayuda en el diagnóstico de MD (Panek et al., 2020).

4.12. Tratamiento

La mayoría de los tratamientos se han enfocado en la disminución de la respuesta inflamatoria, y la promoción de la neuro-regeneración. En este sentido, se han ensayado diversos protocolos terapéuticos (Pellegrino, 2013).

Durante mucho tiempo, el protocolo más utilizado y considerado de mayor eficacia era el propuesto por Clemmons (1992). Este se basaba en tres pilares que debían combinarse y aplicarse de forma temprana: ejercicio físico (incluía caminar, correr y/o nadar de forma rutinaria con aumentos graduales de frecuencia y duración), soporte vitamínico (vitaminas del complejo B y E) y la administración de ácido épsilon aminocaproico (Clemmons, 1992; de Guzzi et al., 2014).

La actividad física ha sido incluida para alcanzar beneficios en la circulación general, así como para el mantenimiento del tono y masa muscular (de Guzzi et al., 2014). En cuanto al soporte vitamínico, la administración del complejo B tenía como fin actuar como soporte para la neuro-regeneración y, la vitamina E, se recomendaba debido a su acción antiinflamatoria (Clemmons, 1992). Otros protocolos propuestos agregaban el uso de la vitamina C, debido a que es estimulante de la actividad fagocítica, y de la producción y función de los linfocitos T (de Guzzi et al., 2014).

A pesar de que no se contaba con evidencia científica, Clemmons (1992) sostenía que el uso del ácido aminocaproico, un agente anti-proteasas mostraba cierta eficacia, probablemente, interfiriendo en procesos que conducían a la

neurodegeneración. Adicionalmente, en otros protocolos, se ha utilizado n-acetilcisteína, un precursor del glutatión, por su efecto antioxidante (Suraniti, et al., 2014). Otros fármacos con los que se ha tratado, sin éxito, a caninos con MD persiguiendo el fin de disminuir o suprimir la respuesta inflamatoria han sido la azatioprina, ciclofosfamida y glucocorticoides (Clemmons 1992, Pellegrino, 2013). Acerca de estos últimos, Clemmons sostenía que su utilización debía ser cautelosa y se justificaba en momentos en que se manifestaban exacerbaciones de los síntomas. La terapéutica con corticoides no ha mostrado beneficios significativos, pero sí, efectos indeseados a altas dosis a largo plazo, como lo es la estimulación del catabolismo del organismo que aumenta la velocidad de deterioro orgánico general (Clemmons, 1992).

Varios autores agregaron dos pilares más al tratamiento de Clemmons: la minimización del estrés y el mantenimiento de una buena calidad de vida teniendo en cuenta analgesia, control de escaras y manejo básico de las funciones genitourinarias (Ferreira et al., 2014). Los resultados obtenidos a partir de estos tratamientos no han promovido mejoras significativas a nivel clínico y de sobrevida, con excepción de terapias de rehabilitación física (Polizopoulou, Koutinas, Patsikas y Soubasis, 2008; Kathmann et al., 2006; Millis y Ciuperca, 2015; Pellegrino, 2013).

4.12.a. Terapia de Rehabilitación

Uno de los pilares del protocolo terapéutico era la rehabilitación física. Las modalidades terapéuticas dentro de la misma tienen como principal objetivo la restauración de la función perdida mediante acciones que promuevan la preservación de fuerza muscular, el retorno a las actividades diarias del individuo y el manejo del dolor (Klos, Coldebella y Covatti, 2020). La fisioterapia es una de estas modalidades y contribuye concretamente en la recuperación de los tejidos mediante la utilización de diversas técnicas terapéuticas (como cinesioterapia y masoterapia) y de agentes físicos (Klos, et al., 2020). La aplicación de este tipo de terapias en caninos se encuentra en expansión debido a la eficacia que han demostrado en el tratamiento de diversas patologías. Sin embargo, aún se cuenta con poca evidencia científica que la respalde (Millis y Ciuperca, 2015).

Desde la publicación de Clemmons hasta la actualidad, la fisioterapia es recomendada como terapia paliativa en caninos con MD. Se considera que su uso incrementa el tiempo de sobrevida de los pacientes afectados (Coates y Wininger, 2010; Kathmann et al., 2006; Miller et al., 2020; Millis y Ciuperca, 2015). En consecuencia, resulta pertinente analizar en detalle los trabajos publicados al respecto publicados hasta el momento.

En un estudio observacional retrospectivo Kathmann et al. (2006) realizaron un seguimiento de las historias clínicas de 50 caninos, con diagnóstico presuntivo de MD, provenientes del archivo del departamento de Neurología Clínica de Medicina Veterinaria de la Universidad de Berne, durante el periodo de 1989 al 2003. A todos los propietarios se les había sugerido la realización de ejercicios de fisioterapia que incluían caminatas, masajes, movimientos pasivos de articulaciones e hidroterapia. De los 50 caninos, a 22 se les logró hacer un seguimiento por vía telefónica. Estos fueron divididos en tres grupos en función de la frecuencia de aplicación del protocolo de fisioterapia reportada por los propietarios. El primer grupo contenía a los animales que habían recibido terapia intensiva, es decir aplicada todos los días. En el segundo

se incluyeron caninos a que habían recibido el tratamiento con intensidad moderada al haber sido aplicada algunos días a la semana. Y en el tercero, había caninos a los que no se les había realizado fisioterapia. Los autores observaron que la terapia intensiva prolongaba los tiempos de ambulación y de sobrevida. La misma fue asociada a un promedio de 255 días de sobrevida (9 caninos), en comparación con 150 días de los que seguían protocolos de terapias moderadas (en 6 caninos), o 55 días en los que no fueron tratados (en 7 caninos). Interesantemente, encontraron que la aplicación de estas terapias en animales con un estadio avanzado de signos neurológicos promovió una mayor sobrevida en comparación a caninos enfermos con poco avance de signos, pero sin tratamiento con fisioterapia (Kathmann et al., 2006).

Una limitación que presenta este trabajo es que la selección de caninos se realizó en base al diagnóstico presuntivo de MD (se tuvieron en cuenta los antecedentes clínicos, edad, y la exclusión de otras enfermedades de la médula espinal, es decir, resultados normales de mielografía, tomografía computada o resonancia magnética). Al no contar con el estudio histopatológico postmortem (con la excepción de 4 animales), no es posible tener certeza de que toda la población estaba efectivamente cursando la enfermedad. Otro aspecto importante es que se trató de un estudio retrospectivo, y que los pacientes no fueron asignados a los grupos al azar, si no que dependió de cada propietario la intensidad de tratamiento que estaba dispuesto a otorgarle a su perro. Esto genera un riesgo de sesgo ya que el compromiso que presenta un propietario con el caso de su mascota, podría ser un factor muy influyente en la longitud de la sobrevida de los caninos. Es decir, los propietarios que pueden dedicarle más tiempo y dinero al tratamiento de sus mascotas, podrían ser aquellos que opten por la eutanasia en etapas más avanzadas de la enfermedad.

También, Miller et al., (2020) realizaron un estudio retrospectivo en el que se evalúa la aplicación de fisioterapia. Ellos buscaron examinar el impacto de agregar la terapia de fotobiomodulación en el plan terapéutico de rehabilitación en caninos con MD. La terapia de fotobiomodulación también llamada láser de bajo nivel, o de baja intensidad, utiliza como recurso terapéutico la emisión de luz no ionizante (Farivar, Malekshahabi y Shiari, 2014). El término fotobiomodulación es considerado como el más preciso para describir el fenómeno biológico que se desencadena en su aplicación (Anders, Lanzafame y Arany, 2015; Pryor y Millis, 2015). En esta terapia se envían a los tejidos fotones de energía lumínica en el rango infra rojo (600 – 1200 nm) que estimulan foto receptores localizados en las células. Al ser estimulados, los fotoreceptores convierten la energía lumínica en reacciones bioquímicas. Uno de los fotoreceptores más importantes de las células es la citocromo C oxidasa. Esta es una enzima polipeptídica que participa de la cadena de transporte de electrones responsable de la generación de ATP, óxido nítrico y moléculas reactivas del oxígeno (Dewey, Brunke y Sakovitch, 2022). En Rehabilitación veterinaria, esta terapia tiene múltiples aplicaciones; se utiliza por sus efectos de control de edemas, antiinflamatorio, analgésico en músculos, tendones, ligamentos, nervios, articulaciones, heridas cutáneas quirúrgicas y no quirúrgicas, entre los más destacados (Pryor y Millis, 2015). Recientemente, Dewey et al. (2022) han propuesto, basado en evidencia preclínica, su potencialidad para el tratamiento de otra de las enfermedades neurodegenerativas más prevalentes en caninos, la disfunción cognitiva canina.

Miller et al., (2020) plantean que los efectos de neuroprotección en las motoneuronas, restauración de la energía celular en los músculos paravertebrales, y/o

inhibición de la fatiga muscular para optimizar su rendimiento; podrían ser promovidos por la terapia de fotobiomodulación en el tratamiento de caninos con MD. Para evaluar el impacto de protocolos de esta terapia, ellos realizaron el análisis de historias clínicas de 20 caninos con diagnóstico presuntivo de MD. El criterio de selección de casos clínicos utilizado es más estricto que en el trabajo anterior, al excluir caninos que no tuvieran resonancia magnética de la columna para descartar otras patologías, pruebas de ADN para mutación SOD1 de la Universidad de Missouri, y/o histopatología post mortem. Sin embargo, los autores destacan que solo contaron con la histopatología de 5 caninos, única herramienta de diagnóstico definitivo. Los caninos fueron sometidos a un tratamiento de fisioterapia intensiva que incluía hidroterapia, cinesioterapia y fotobiomodulación en segmentos medulares torácicos caudales (desde T3 a unión lumbosacra). La población se dividió en 2 grupos: A (6 caninos) y B (14 caninos) en función del protocolo de fotobiomodulación que había sido utilizado para el tratamiento (Cuadro 3). En ambos protocolos la terapia con láser se aplicó directamente en sobre el pelo y la piel de la zona de la columna vertebral y a 5-7 cm laterales a los lados derecho e izquierdo de la misma, en la musculatura paraespinal.

Cuadro 3. Protocolos A y B utilizados para terapia con fotobiomodulación en estudio de Miller et al. (2020)

Parámetros de luz	Protocolo A	Protocolo B
Longitud de onda (nm)	904	908
Poder radiante (W)	0.5	6-12
Irradiación en la superficie de la piel (W/cm ²)	0.5	1.2-2.4
Fluencia (J/cm ²)	8 por punto	14-21 sobre área
Área de tratamiento (cm ²)	Patrón punto a punto	Patrón de cuadrícula en movimiento continuo
Tiempo de tratamiento	650-1000 5 min	650-1000 25-26min

Modificado de Miller et al. (2020).

Al comparar los efectos terapéuticos de ambos protocolos, los autores observaron que el periodo de tiempo entre el inicio de los síntomas y la eutanasia de los caninos del grupo B ($38,2 \pm 14,67$ meses) fue más extenso que los de los del grupo A ($11,09 \pm 2,68$ meses). Y, que el período entre el inicio de los síntomas y el desarrollo de paresia no ambulatoria o parálisis de los integrantes del grupo B ($31,76 \pm 12,53$ meses), fue más prolongado en comparación con el de los casos de A ($8,79 \pm 1,60$ meses). A su vez, los autores, contrastaron sus resultados con datos históricos provenientes de los estudios de Kathmann et al., (2006), Polizopoulou et al. (2008) y Kanazono et al. (2013), elegidos por haber tomado un importante número de caninos con MD como población de estudio. Estos aplicaron terapias variadas (incluyendo

fisioterapia en algunos individuos) y evaluaron la progresión del estado ambulatorio y/o la sobrevida de los individuos. Miller et al. (2020), consideraron que la sobrevida del grupo A es similar a la de estos estudios (Kathmann et al. (2006): 8,36 meses y Polizopoulou et al. (2008): 16,334 meses). Adicionalmente el tiempo al desarrollo de paresia no ambulatoria de los casos de A, fue similar a los 10 meses en promedio que obtuvieron Kanazono et al (2013).

Los dos protocolos utilizados, ya han mostrado grados de eficiencia en otras patologías, pero difieren en el valor de irradiancia en la superficie de la piel. Los autores han explicado que la diferencia de efecto, por la variación en este parámetro, está ligado a la cantidad de energía lumínica que queda disponible para ser absorbida en la médula espinal, luego de atravesar los otros tejidos (Miller et al., 2020).

Otra alternativa terapéutica utilizada y estudiada para caninos con MD es la acupuntura. Esta terapia surge en la medicina tradicional china veterinaria, la cual se aplica en animales hace más de 2000 años (Xie et al., 2018). La misma consiste en la introducción de agujas o transferencia de calor en puntos específicos del cuerpo (puntos de acupuntura) con el fin de estimular la acción del sistema neuroendócrino (Klos et al., 2020). Se sugiere que podría ser de utilizada en caninos con MD ya que podría mejorar la transmisión del impulso nervioso y controlar la neuroinflamación (Oliveira, Krüger, Pinto, Gianotti, y Contesini2012). Sin embargo, los trabajos publicados al respecto de su uso presentan varias limitantes.

Oliveira et al., (2012), publicaron un relato de caso clínico de una perra pastor belga con diagnóstico definitivo de MD. Se trata de un relato que no detalla de forma precisa la sintomatología clínica, la evolución ni detalles del tratamiento aplicado. Ellos describen que se presenta a la consulta una perra con dolor lumbar crónico, contractura muscular en la zona y déficit propioceptivo, además no presentaba alteraciones en estudios radiológicos y, no había respondido a un tratamiento previo basado en reposo y administración de corticoides. Se realizaron únicamente 3 sesiones de acupuntura, de las que no se cuentan con detalles de frecuencia de aplicación, y los propietarios interrumpieron el tratamiento durante 2 meses, momento en el cual la perra presentaba paraparesia. En esta etapa, luego de una única sesión de acupuntura, la perra presentó signos de mayor estabilidad, logrando mantenerse en estación. Luego de cuatro semanas de tratamiento, la perra lograba desplazarse, pero, sin apoyar el MPD. Finalmente, los autores describen que volvió a padecer paraparesia, momento en el que se diagnosticó MD, de forma presuntiva. Se describe que continuó desmejorando de forma progresiva hasta su eutanasia.

Al analizar este caso clínico, es posible señalar discrepancias con el curso clínico habitual de MD. Aunque el déficit propioceptivo, la paraparesia y la descripción de la etapa final con afección de forma progresiva se asemejan a la enfermedad, contándose con un diagnóstico definitivo de la misma; la perra en una primera etapa, desde la aparición de los signos hasta los 8 meses posteriores aproximadamente, presentó dolor lumbar crónico y claudicación de MPD, signos que no son propios de MD. Entonces, es posible cuestionar si no habría otra patología influyendo en concomitancia. Como se explicitó anteriormente, esta publicación no contiene un relato exhaustivo de los signos ni de su evolución, además de carecer de detalles acerca de la aplicación de la terapia: no se conoce información acerca de los puntos de aplicación, duración de la sesión, frecuencia entre sesiones, ni periodo de tiempo en que se le estuvo realizando el tratamiento. Tampoco se manejan criterios objetivos para la evolución de la eficacia del tratamiento.

En contraste, un trabajo publicado por Xie et al., (2018), que se centra en la discusión de la aplicación de acupuntura y medicina herbal en tres casos clínicos de caninos con MD (con diagnóstico presuntivo y con evoluciones clínicas que están en concordancia con la patología), se presenta con información detallada de la terapia de acupuntura utilizada en cada caso y en cada momento, así como de las preparaciones de medicina herbal seleccionadas para esos casos. Los autores relatan que observaron “mejoras” en la calidad de vida de los caninos, destacando que habría cierta tendencia a que la aplicación de estas terapias en etapas tempranas de la enfermedad, cuando los caninos aún pueden desplazarse, enlentecería la progresión de la enfermedad e incluso, especulan que podría revertirla. En contraste con su aplicación tardía, en el paciente no ambulatorio, que se asocia con una menor eficacia del tratamiento (Xie et al., 2018). Sin embargo, este trabajo presenta como limitante que no se definen criterios claros para cuantificar las mejoras de las terapias aplicadas. Por ejemplo, no utilizan cuestionarios validados para la evaluación de calidad de vida. Además, no se cuenta con la confirmación del diagnóstico de MD de los individuos tratados.

Por lo tanto, se vuelve a remarcar la necesidad de realizar estudios que se aproximen a resultados más confiables, en cuanto la aplicación de protocolos terapéuticos de rehabilitación como los discutidos anteriormente.

4.12.b. Uso de nutraceuticos.

La curcumina es un compuesto que proviene de la cúrcuma que se ha utilizado tradicionalmente en medicina asiática por su potencial antitumoral, antiinflamatorio, neuroprotector y antimicrobiano (Ahmadi et al., 2018; Pinto, 2016).

En medicina humana, la administración de nanocurcumina, curcumina a la que se le ha modificado con nanotecnología para potenciar su biodisponibilidad y efectos en los organismos, se ha evidenciado como beneficiosa y segura al utilizarse como complemento en terapias de individuos con ELA, en los que se sugiere que su uso aumenta el tiempo de sobrevivencia (Ahmadi et al., 2018; Pinto, 2016; Kobatake et al., 2021).

Estos beneficios se asocian con su acción antioxidante y antiinflamatoria en el SNC y, con que varios estudios sugieren que la curcumina actuaría evitando la formación de agregados de la SOD1 mutada. Asimismo, tiene efectos en la homeostasis del tejido muscular, al promover la síntesis proteica, disminuir la degradación muscular y prevenir lesiones (Bhatia et al., 2015; Fang y Nazir, 2021; Mañas-García, Bargalló, Gea y Barreiro, 2020)

A partir de esta evidencia, Kobatake et al., (2021) realizaron un trabajo en el que analizaron el curso clínico de la patología (desde su inicio hasta estadios finales) en 40 caninos con diagnóstico confirmatorio de MD. Adicionalmente, incluyeron la administración de curcumina en la terapia de 8 de estos caninos. Al contrastar aparición de signos entre el grupo control y el tratado, los autores observaron que, de forma similar a los resultados observados en humanos, la sobrevivencia fue más extensa en el grupo tratado (43 meses (36–47) versus 34 meses (18–52)). Los autores sugieren que el análisis comparativo de la progresión de los síntomas entre ambos grupos no es posible debido a la diferencia de tamaño de ambos, pero, comentan que, aunque observan que hay diferencias entre el tiempo en que los animales dejan de

poder mantenerse en estación entre ambos grupos (siendo más favorable para los tratados con curcumina), el tiempo de aparición de la falla respiratoria en fases finales no tuvo diferencias significativas. Aquí es interesante señalar que una limitación que presenta este trabajo es que el tratamiento fue aplicado a pocos caninos y su elección no fue al azar. Estas diferencias de tiempo de aparición de síntomas y extensión de sobrevida también pueden estar ligadas al riesgo de sesgo, como se explicó para otros trabajos.

4.12.c. Terapia con Células Madre

Las células madre son células derivan de una única célula-huevo y se caracterizan por ser autorrenovables, indiferenciadas y capaces de regenerarse a sí mismas y de diferenciarse en múltiples tipos de células maduras especializadas (Dominici, et al. 2006).

Algunas pueden diferenciarse en cualquier tipo de célula (totipotenciales), otras en varios tipos celulares (pluripotenciales) y otro grupo en un único tipo celular (unipotenciales). Pueden obtenerse de diversos tejidos, las células madre embrionarias, por ejemplo, se obtienen de la masa celular interna del blastocisto. Por otro lado, las células madre adultas provienen de diversos tejidos adultos como médula ósea o tejido adiposo. Por último, también es posible clasificarlas dependiendo de si son obtenidas del propio individuo al que se le van a trasplantar (autólogo) o de otro individuo (heterólogo), para utilizarse con el objetivo de regeneración celular local (Nayak et al., 2006).

El trasplante de cultivos de células madre se ha propuesto como una estrategia prometedora para ser aplicada en enfermedades neurodegenerativas humanas (como Parkinson, ELA, Alzheimer, Esclerosis Múltiple, Enfermedad de Huntington) (Ahani-Nahayati et al., 2021). Inicialmente, su implementación se orientó a la sustitución de los grupos celulares afectados en cada una de estas patologías, pero, se ha observado que su rol no solamente consiste en diferenciarse y reemplazar tejido dañado si no que son capaces de producir moléculas promotoras de regeneración, estimulando células progenitoras endógenas, e inmunomoduladoras con grandes efectos benéficos (Nayak et al., 2006; Sandrock, 2010).

En estudios con modelos de ELA, se presentaron dificultades en la sustitución de motoneuronas degeneradas por células madre que lograran diferenciarse y desarrollar proyecciones de axones a distancia, así como hacer sinapsis con neuronas endógenas y músculos, por encontrarse inmersas en un microambiente patológico, no propicio. Por lo que nuevos estudios están apuntando a la promoción de condiciones favorables para la aplicación de terapias celulares que garanticen la neuroprotección y retarden la neurodegeneración (Ahani-Nahayati et al., 2021; Baloh, Glass y Svendsen, 2018; Goutman et al., 2019).

Los estudios preclínicos para ELA, han utilizado mayoritariamente modelos murinos con SOD1 mutada, para el trasplante de múltiples líneas de células madre (Ahani-Nahayati et al., 2021; Goutman, Savelieff, Sakowski y Feldman, 2019). A partir de estos, se ha obtenido evidencia que sustenta su potencial terapéutico: clínicamente, se han observado beneficios en el enlentecimiento de la progresión de signos clínicos y en la prolongación en la sobrevida de individuos afectados; mientras

que, resultados de análisis histopatológicos y de expresión génica, muestran la diferenciación de células madre en neuronas que se unieron a las del hospedador, la disminución de marcadores específicos de inflamación del SNC y la cuantificación de factores neurotróficos que modificarían el ambiente patológico (Goutman et al., 2019).

Los factores neurotróficos como factor neurotrófico derivado del cerebro, factor neurotrófico derivado de la línea de células gliales, factor de crecimiento insulínico tipo 1 y factor de crecimiento del endotelio vascular (Capella, Ciotti, Cohen-Tannoudji y Biferi, 2019), son proteínas endógenas secretadas por las células en respuesta a situaciones locales, que van guiando la diferenciación y la supervivencia celular en el desarrollo y garantizan el mantenimiento del SN (Ruozi, 2012; Tovar y Romo, Ramírez-Jarquín, Lazo-Gómez y Tapia, 2014). Su aplicación temprana o anterior a la instalación de síntomas neurológicos en modelos murinos, ha generado un impacto positivo en la supervivencia de las motoneuronas. En contraste con su aplicación en momentos posteriores, al desatarse los mecanismos nocivos de la patología, donde se ha observado que el efecto de los factores neurotróficos es de muy corta duración (Goutman et al., 2019; Tovar y Romo, 2014). También se han ensayado estudios en humanos, investigaciones clínicas fase uno y dos, que han demostrado la seguridad de la aplicación de trasplante celular por distintas vías tales como intravenosa, intraarterial, intratecal, intraespinal e intracerebelar. Sin embargo, es imprescindible realizar más investigaciones para conocer su impacto terapéutico (Goutman et al., 2019).

Acerca de esta terapia en el campo de investigación de la medicina veterinaria, se encuentran dos estudios que experimentaron el trasplante de células madre en caninos que presentaban patologías en el sistema nervioso central. Ambos tienen como objetivos en común la evaluación de la seguridad y de la viabilidad del trasplante de células madre, independientemente de las vías de administración elegidas (Malysz-Cymborska et al., 2021; Zeira et al., 2015).

Si bien no existen hasta el momento trabajos que hayan evaluado la eficacia del uso de células madre en perros con MD, existen estudios que han demostrado la seguridad del trasplante de células madre de estirpe mesenquimal por vía intravenosa (IV), intraarterial (IA) y/o intratecal (IT) (Malysz-Cymborska et al., 2021; Zeira et al., 2015). Malysz-Cymborska et al. (2021) realizaron el trasplante de cultivos celulares heterólogos de origen mesenquimal, en cinco caninos con diagnóstico presuntivo (y confirmatorio posterior) de MD, mediante la vía IA, confirmándose la ausencia de efectos adversos luego de esta intervención. También, aplicaron cultivos heterólogos de precursores restrictivos de células gliales, mediante la misma vía, sin identificar efectos adversos en tres caninos (Malysz-Cymborska et al., 2021). El estudio de Zeira et al. (2015), ofrece evidencia de seguridad en el trasplante de células mesenquimales autólogas al SNC. En este caso, fue realizado en ocho caninos con diagnóstico de meningoencefalomielitis de origen desconocido que habían estado bajo tratamiento con prednisona, citosina arabinosida, fenobarbital y/o levatiracetam. La terapia fue segura en todos, reportándose hipertermia como único efecto adverso experimentado por un canino (Zeira et al., 2015).

Además de la seguridad, estos trabajos evaluaron la viabilidad con la que llegaban esas células a los destinos deseados. En ambos trabajos se pudo ver que las células mesenquimales, mediante las tres vías de administración, lograron acumularse en cantidades significativas en diferentes regiones del SNC que fueron analizadas. Zeira et al. (2015), observaron que la vía IV estaba relacionada con un

efecto clínico de aparición más tardía pero que fue más prolongado en el tiempo que por la vía IA. Por otra parte, Malysz-Cymborska et al. (2021) observaron que los cultivos de precursores restrictivos de células gliales, no se acumularon en cantidades aceptables en el SNC en su aplicación por vía IA.

Por último, respecto a la eficacia, en el estudio de Malysz-Cymborska et al. (2021), no se realizó una evaluación clínica de los pacientes postratamiento, pero se cuantificó la expresión génica de varios ARNm del cerebro, relacionados con la funcionalidad neurológica, mediante PCR a tiempo real; detectando que en dos de estos, la molécula adaptadora de unión a calcio ionizada 1 (Iba 1) y la proteína ácida fibrilar glial (GFAP), se encontraban reducidos. La Iba1 es uno de los marcadores que se ha encontrado expresado por la microglía durante la progresión de ELA en modelos animales, usualmente asociado a la migración y fagocitosis. Mientras que, la proteína ácida fibrilar glial, estimula la expresión de marcadores inflamatorios como ciclooxygenasa 2, óxido nítrico sintetasa inducible y óxido sintetasa neuronal. En modelos de ratas con SOD1 mutada, la detección de ambos se realiza para identificar glías aberrantes rodeando motoneuronas en degeneración; Iba 1 es uno de los que sirve para reconocer oligodendrocitos y GFAP se utiliza para astrocitos (Ibarburu, 2017). Dada la constatación de su reducción en el ensayo, la introducción de células madre mesenquimales en caninos con MD podría cumplir un rol clave en el control de la neuroinflamación (Ibarburu 2017, Malysz-Cymborska et al., 2021).

4.12.d. Terapia Génica

Dentro de los tratamientos que han mostrado potencial para su uso en MD, se encuentra la terapia génica. Existe una amplia gama de estudios que ensayan su aplicación con interés en contrarrestar efectos de varias enfermedades neurodegenerativas humanas, entre ellas ELA (Amado y Davidson, 2021; Pena et al., 2019).

La terapia génica comprende procesos de transferencia de material genético, tanto ADN como ARN, a un organismo con fines terapéuticos. Se han desarrollado modalidades variadas para su implementación terapéutica estratégica (Amado y Davidson, 2021; Pena et al., 2019). Estas pueden tener como objetivo el reemplazo de un gen mutado por otro normal mediante la introducción de copias funcionales del gen, el silenciamiento de un gen actuando sobre su ARNm (ARN mensajero), la adición de factores de protección o beneficiosos, o la edición en un genoma mutado (Capella et al., 2019). El material genético se puede entregar desnudo, mediante vectores virales, o por sistemas físicos o químicos como nanopartículas (Amado y Davidson, 2021). Los vectores virales utilizados para estudios de enfermedades neurodegenerativas son Adenovirus, virus adenoasociados, Herpesvirus y Retrovirus (Pena et al., 2019).

En las últimas décadas, se han realizado investigaciones con diversos enfoques terapéuticos en esta área, en función del tipo de ELA a tratar. Dentro de los mecanismos de terapia génica libres de vectores, podemos encontrar la introducción de oligonucleótidos antisentido (ASO), que son cadenas nucleotídicas cortas que se unen a pre-ARNm o a ARNm, para modular la expresión génica o para alterar la maduración del ARN. Es una de las modalidades que está siendo ampliamente ensayada en búsqueda de la prevención de la expresión de la SOD1 mutada (Corcia, Beltran, Bakkouche y Couratier, 2021; Masrori y Van Damme, 2019). Tofersen es uno

de los ASO más estudiados, después de haber sido evaluado en investigaciones preclínicas, de fase uno y dos, está siendo probado en un estudio en fase tres en este momento (Corcia et al., 2021; Mueller et al., 2020; <https://www.als.org/research/emerging-drugs/tofersen>).

Las otras modalidades que se están investigando, con la SOD1 como centro, se encuentran en fase preclínica, siendo evaluadas en modelos murinos (Amado y Davidson, 2021). Una de ellas es la conocida como "CRISP-Cas9", que a partir de la acción de endonucleasas (porción Cas9 del sistema) en sitios específicos del gen *SOD1* mutado, se generan cortes y se promueven mecanismos celulares para su reparación (Amado y Davidson, 2021; Pena et al., 2019).

Al igual que los ASO, los siARN (ARN de interferencia cortos) son un mecanismo postranscripcional de silenciamiento génico. Los siARN son moléculas de ARN doble cadena, de 19 a 23 nucleótidos, que ingresan a las células y se ensamblan en un complejo de silenciamiento inducido por ARN. Este complejo actuará sobre el ARNm de la célula, para generar cambios en la expresión génica del gen *SOD1* mutado (por degradación del ARNm o manipulación del splicing alternativo) (Capella et al., 2019).

Por otra parte, existe un campo de la terapia génica que investiga la introducción de factores neurotróficos y no neurotróficos mediante vectores virales. Como se comentó anteriormente, se sugiere que estos podrían promover efectos positivos en ELA, por lo que se apunta a encontrar formas de que alcancen el SNC, la unión neuromuscular y los músculos (Amado y Davidson, 2021).

Hasta el momento, no hay publicaciones de ensayos clínicos de la terapia génica en MD. Pero se han presentado algunos estudios que se enfocan en su potencial aplicación terapéutica en patologías neurodegenerativas en el SNC. Swain et al. (2014), realizaron una investigación en la que introdujeron cuatro serotipos de virus adenoasociados (AAV2/1, AAV2/5, AAV2/9 y AAV2/rh10) en 8 caninos de 12 a 18 semanas de edad por vía intracerebral con el fin de conocer el comportamiento de los diferentes serotipos de estos vectores. Los virus portaban genes reporteros, es decir, genes que expresan marcadores que permite la posterior visualización de los sitios de expresión mediante análisis histopatológico postmortem (Clark, Pazdernik y McGehee., 2019). Dos de los serotipos (AAV2/9 y AAV2/rh10) se mostraron como candidatos interesantes para estudios futuros, al lograr la traducción eficiente de los genes en zonas de la corteza cerebral, núcleo caudado, tálamo y la cápsula interna del cerebro. Esta tuvo gran importancia en las neuronas, se evidenció en menor medida en astrocitos, y pobremente, en oligodendrocitos. Los caninos vivieron 5 semanas post aplicación y luego, se realizó la eutanasia y necropsia para su análisis histopatológico. En la publicación no se detalla si alguno de los caninos sufrió efectos adversos.

Por otra parte, otro grupo de investigadores ha desarrollado una serie de experiencias sobre la aplicación de esta terapia en Dachshunds, utilizados como modelo natural de lipofuscinosis neuronal ceroida. Esta es una patología neurodegenerativa de herencia recesiva, específicamente un trastorno de almacenamiento lisosómico, causado por una delección de un nucleótido citosina en el exón 4 del gen *TPP1* encargado de codificar la enzima Tripeptidil Peptidasa 1 (TPP1) (Katz et al., 2015). La mutación produce un corrimiento en el marco de lectura del gen, y en consecuencia, la aparición de un codón stop prematuro que da lugar a una proteína trunca, incapaz de cumplir su función (OMIA, 2022).

Varios investigadores (Katz et al., 2015; Katz, Jensen, Student, Johnson y Coates, 2017; Whiting et al., 2016) trabajaron sobre una línea de caninos con lipofuscinosis neuronal ceroida, que fue criada en la Universidad de Missouri. Se seleccionaron individuos homocigotas recesivos para la mutación y se crearon dos grupos: uno fue tratado con terapia génica y el otro no recibió tratamiento a excepción de antiinflamatorios si se consideraba necesario. Los autores detectaron que a partir de la aplicación de un virus adenoasociado con material genético para la expresión de la TPP1 por vía intracerebroventricular, el mismo se traduciría en las células endoteliales, dando como resultado una concentración estable de la proteína de TPP1 en líquido cefalorraquídeo, con amplia distribución en todo el SNC. Además, observaron que esta terapia resulta eficaz ya que, al aplicarla previamente a la observación de los primeros signos clínicos, lograron retardar el inicio de la enfermedad. A su vez, en los animales tratados, la progresión de la enfermedad fue más lenta y la supervivencia prolongada. Los profesionales que hicieron el seguimiento clínico de la población enferma conocían si estaban siendo tratados con terapia génica o no, esto es un aspecto a tener en cuenta, ya que le agrega subjetividad al ensayo. Sin embargo, las observaciones clínicas se vieron corroboradas con el análisis histopatológico, mediante detección de la GFAP y de marcadores para la acumulación de material autofluorescente típico de la patología; los caninos tratados presentaron menor depósito de estos compuestos (Katz et al., 2015).

También se destaca la seguridad de la aplicación de estas técnicas (Katz et al., 2015; Swain et al. 2014), sin dejar de considerar que en algunos casos fueron administrados fármacos para evitar efectos no deseados, por ejemplo, en el estudio de Katz et al. (2015) se administraron corticoides en respuesta a incrementos en niveles de células nucleadas del LCR lo cual fue tomado como indicativo de inflamación en SNC.

4.12.e. *Terapia con cannabinoides*

El sistema endocannabinoide ha sido identificado en una gran variedad de seres vivos, entre ellos, humanos y animales domésticos. Estos secretan cannabinoides endógenos que se unen a receptores específicos con el fin de equilibrar diversas funciones orgánicas. Se ha comprobado que los cannabinoides provenientes de la planta *Cannabis sativa*, se unen a los receptores del sistema endocannabinoide generando diversos efectos que están siendo investigados y aplicados para contrarrestar procesos patológicos (Hartsel, Boyar, Pham, Silver, y Makriyannis, 2019).

Diversos estudios sugieren que la administración de cannabinoides es potencialmente útil para contrarrestar efectos de patologías neurodegenerativas tanto en medicina humana como en veterinaria (Giacoppo y Mazzon, 2016; Mondino, Sosa, Santiestéban y Bentancurt, 2020; Scotter, Abood y Glass, 2010).

Se ha comprobado que los fitocannabinoides, cannabinoides presentes en la planta de cannabis, tetrahidrocannabinol Δ^9 -THC y cannabidiol (CBD), poseen gran capacidad antioxidante, por lo que podrían fomentar la neuroprotección en ambientes donde predomina la liberación de especies reactivas de oxígeno (Cassano et al., 2020; Hacke et al., 2019; Russo y Guy, 2006). Otro aspecto interesante acerca de los mismos es que actúan como inmunomoduladores al unirse a los receptores CB2, por

lo cual tendrían la potencialidad de reducir la neuroinflamación que se desata en la MD (Cassano et al., 2020; Scotter et al., 2010).

Mientras el CBD es un compuesto que posee muy baja afinidad por los receptores del sistema endocannabinoide (receptores endocannabinoides CB1 y CB2) (Pertwee, 2012), el $\Delta 9$ -THC se ha utilizado en varios estudios preclínicos de modelos murinos de ELA (con una mutación de la SOD1), ya que se comporta como agonista del receptor CB2 en los que se discute que el $\Delta 9$ -THC podría estimular vías de control del estrés oxidativo y la excitotoxicidad (Giacoppo y Mazzon, 2016).

En estudios con modelos murinos para ELA, se han utilizado diferentes formulaciones de cannabinoides, lo que implica dificultades al momento de realizar un análisis comparativo (Urbi et al., 2019). Sin embargo, dentro de los hallazgos que se han obtenido hasta el momento, predomina el impacto beneficioso en el tiempo de supervivencia de los animales bajo terapias con estos compuestos. Y, en la mayoría de estos trabajos, se puede destacar una tendencia en el retraso de la progresión del proceso neurodegenerativo y de sus consecuencias clínicas (Urbi et al., 2019). Estos coinciden en que el efecto positivo ocurre cuando son administrados en las etapas tempranas de la enfermedad, obteniendo resultados erráticos en etapas tardías (Giacoppo y Mazzon, 2016; Moreno, Espejo, Fernández, y De Lago, 2014). Al momento de analizar administraciones en estadios más avanzados se encuentran experiencias con resultados variables; en varios se presenta eficacia aunque a medida que la enfermedad progresa, todos coinciden en que esta decrece (Giacoppo y Mazzon, 2016; Moreno et al., 2014). Otros efectos interesantes, obtenidos de la administración de estos compuestos en personas con ELA se relacionan con la disminución de espasmos musculares y de la percepción del dolor crónico, control de sialorrea y mejoras en apetito y estado de ánimo (Carter, Abood, Aggarwal y Weiss, 2010).

En medicina veterinaria se cuenta con un único estudio en caninos con MD donde Fernández et al. (2017), evaluaron la expresión de genes de endocannabinoides en médulas espinales de caninos sanos en comparación con las de caninos que padecieron MD. A partir del análisis de tejidos post mortem de todos los animales, observaron que la concentración de receptores CB2 en astrocitos se encuentra incrementada en los caninos con diagnóstico definitivo de MD en comparación con los sanos. En contraste, no se observaron diferencias en los genes para la detección del receptor CB1, así como enzimas que sintetizan y degradan endocannabinoides. Los autores teniendo en consideración los hallazgos en modelos murinos para la mutación SOD1 y en modelos de otras patologías neurodegenerativas de humanos, plantean su afinidad con la teoría de que el aumento de receptores CB2 en astrocitos se relaciona a una respuesta endógena del sistema endocannabinoide destinada a la restauración de la homeostasis del ambiente neuronal agredido. Por lo que surge la necesidad de indagar en este campo, para conocer si los receptores CB2 podrían ser utilizados con el fin terapéutico de enriquecer el ambiente neuronal en casos de MD. Una revisión más detallada del potencial uso de cannabis medicinal en MD puede encontrarse en Dávila, Artigas y Mondino (2020).

5. CONCLUSIONES.

- La MD es una enfermedad degenerativa de curso fatal en caninos. Presenta distribución mundial, siendo diagnosticada en caninos de múltiples razas y cruas.
- Su base genética, evolución fisiopatológica y signología clínica se condicen con el ELA SOD1 familiar, lo cual recientemente ha reforzado su interés a nivel de investigación.
- Aunque, todavía no se cuenta con una prueba diagnóstica antemortem para confirmar la enfermedad, se dispone de pruebas de genotipado para la SOD1, como PCR + RPLF, de realización sencilla y económica, que aportan información tanto para en el diagnóstico individual como en el desarrollo de nuevas estrategias de prevención a nivel poblacional.
- Actualmente las terapias que conforman la rehabilitación están siendo utilizadas como un tratamiento paliativo, sobre todo aplicado en estadios tempranos. Sin embargo, esto debe ser estudiado en mayor profundidad.
- Es preciso que se realice una evaluación de la eficacia de las potenciales terapias en estado de investigación, mediante ensayos clínicos que implementen modalidades de tipo prospectivo doble ciego, y así aporten mayor rigurosidad en la obtención de resultados.

6. BIBLIOGRAFÍA

- Ahani-Nahayati, M., Shariati, A., Mahmoodi, M., Olegovna Zekiy, A., Javidi, K., Shamlou, S., ... Hassanzadeh, A. (2021). Stem cell in neurodegenerative disorders; an emerging strategy. *International Journal of Developmental Neuroscience*, 81(4), 291–311
- Ahmadi, M., Agah, E., Nafissi, S., Jaafari, M. R., Harirchian, M. H., Sarraf, P., ... Tafakhori, A. (2018). Safety and efficacy of nanocurcumin as add-on therapy to riluzole in patients with amyotrophic lateral sclerosis: A pilot randomized clinical trial. *Neurotherapeutics*, 15(2), 430-438.
- Aige, V., y Morales, C. (2012) Anatomía del sistema nervioso. En C. Morales y P. Montoliu, *Neurología canina y felina*. (pp. 1-52) Barcelona: Multiméfica.
- ALS Association (2022). *Biogen in partnership with Ionis Pharmaceuticals. Tofersen*. Recuperado de <https://www.als.org/research/emerging-drugs/tofersen>.
- Amado, D. A., y Davidson, B. L. (2021). Gene therapy for ALS: A review. *Molecular Therapy*, 29(12), 3345–3358.
- Anders, J. J., Lanzafame, R. J y Arany, P. R. (2015). Low-level light/laser therapy versus photobiomodulation therapy. *Photomedicine and Laser Surgery*, 33(4), 183-184.
- Averill, D.R., Jr. (1973). Degenerative myelopathy in the aging German shepherd dog: clinical and pathologic findings. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 162(12), 1045–1051.
- Awano, T., Johnson, G. S., Wade, C. M., Katz, M. L., Johnson, G. C., Taylor, J. F., ... Coates. (2009). Genome-wide association analysis reveals a SOD1 mutation in canine degenerative myelopathy that resembles amyotrophic lateral sclerosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(8), 2794–2799.
- Baloh, R. H., Glass, J. D., y Svendsen, C. N. (2018). Stem cell transplantation for amyotrophic lateral sclerosis. *Current opinion in neurology*, 31(5), 655–661.
- Bartel, D. (2009). MicroRNAs: Target Recognition and Regulatory Functions. *Cell*, 136(2), 215-233.
- Bhatia, N.K., Srivastava, A., Katyal, N., Jain, N., Khan, M.A., Kundu, B., y Deep, S. (2015). Curcumin binds to the pre-fibrillar aggregates of Cu/Zn superoxide dismutase (SOD1) and alters its amyloidogenic pathway resulting in reduced cytotoxicity. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*, 1854(5), 426–436.
- Boeykens, F., Peelman, L., Bhatti, S., y Broeckx, B. (2020). Genetic insights in canine degenerative myelopathy. *Vlaams Diergeneeskundig Tijdschrift*, 89(5), 253–261.
- Braund, K. G., y Vandeveld, M. (1978). German Shepherd dog myelopathy a morphologic and morphometric study. *American Journal of Veterinary Research*, 39(8), 1309–1315.
- Cappella, M., Ciotti, C., Cohen-Tannoudji, M., y Biferi, M. G. (2019). Gene Therapy for ALS-A Perspective. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(18), 4388.

- Capucchio, M. T., Spalenza, V., Biasibetti, E., Bottero, M. T., Rasero, R., Dalmaso, A., y Sacchi, P. (2014). Degenerative myelopathy in German Shepherd Dog: comparison of two molecular assays for the identification of the SOD1:c.118G>A mutation. *Molecular Biology Reports*, 41(2), 665–670.
- Carter, G. T., Abood, M. E., Aggarwal, S. K., y Weiss, M. D. (2010). Cannabis and amyotrophic lateral sclerosis: hypothetical and practical applications, and a call for clinical trials. *The American Journal of Hospice & Palliative Care*, 27(5), 347–356.
- Cassano, T., Villani, R., Pace, L., Carbone, A., Bukke, V. N., Orkisz, S., ... Serviddio, G. (2020). From Cannabis sativa to Cannabidiol: Promising Therapeutic Candidate for the Treatment of Neurodegenerative Diseases. *Frontiers in Pharmacology*, 11, 1–10.
- Castillo, Y., Riverón, G., y Li, F. (2014). Superóxido dismutasa citosólica y enfermedades genéticas. *Revista Cubana de Genética Comunitaria*, 8(1), 5–11.
- Chang, H. S., Kamishina, H., Mizukami, K., Momoi, Y., Katayama, M., Rahman, M. M., ... y Yamato, O. (2013). Genotyping assays for the canine degenerative myelopathy-associated c. 118G> A (p. E40K) mutation of the SOD1 gene using conventional and real-time PCR methods: a high prevalence in the Pembroke Welsh Corgi breed in Japan. *Journal of Veterinary Medical Science*, 12-0451.
- Chang, R. C., Parakh, S., Coates, J. R., Long, S., y Atkin, J. D. (2019). Protein disulphide isomerase is associated with mutant SOD1 in canine degenerative myelopathy. *Neuroreport*, 30(1), 8–13.
- Clark, D.P., Pazdernik, N.J., y McGehee, M.R. (2019). Analysis of Gene Expression. En: Clark, D.P, Pazdernik, N.J., Michelle R. McGehee (Eds.) *Molecular Biology* (3ªed., pp. 965-971). London: Elsevier.
- Clemmons, R. M. (1992). Degenerative myelopathy. *The Veterinary clinics of North America. Small animal practice*, 22(4), 965–971
- Cloutier, F., Marrero, A., O'Connell, C., y Morin, P. (2015). MicroRNAs as Potential Circulating Biomarkers for Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Journal of Molecular Neuroscience*, 56(1), 102-112.
- Coates, J.R. (2014). Paraparesis. En S. Platt y N.J. Olby (Ed.), *BSAVA Manual of Canine and Feline Neurology*. (4ªed., pp. 297 - 327). Gloucester: British Small Animal Veterinary Association.
- Coates, J.R., March, P.A., Oglesbee, M., Ruaux, C.G., Olby, N.J., Berghaus, R. D., ... Williams D.A. (2007). Clinical Characterization of a Familial Degenerative Myelopathy in Pembroke Welsh Corgi Dogs. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 21(6), 1323-1331.
- Coates, J.R., y Winger, F.A. (2010). Canine Degenerative Myelopathy. *Veterinary Clinics of North America. Small animal practice*, 40(5), 429-450.
- Corcia, P., Beltran, S., Bakkouche, S. E., y Couratier, P. (2021). Therapeutic news in ALS. *Revue Neurologique*, 177(5), 544–549.
- Crisp, M. J., Beckett, J., Coates, J. R., y Miller, T. M. (2013). Canine Degenerative Myelopathy: biochemical characterization of superoxide dismutase 1 in the first naturally occurring non-human amyotrophic sclerosis model. *Bone*, 248(1), 1–9.

- Dávila V., Artigas R., y Mondino A. (2020). Tratamiento con cannabis para Mielopatía Degenerativa: ¿Qué se sabe hasta el momento? *ESPECIAL VETCANN 2 - 2020, REMEVET*, 2, 43-45.
- De Guzzi, R.F., Formenton, M.R., Colomba, K.P., Veras, M., Joaquim, J.G., & Fantoni, D.T. (2017). Mielopatía Degenerativa em cães: um desafio na medicina veterinária e na reabilitação animal. *UNIMAR CIÊNCIAS*, 23(1-2), 12-16.
- De Lahunta, A., Glass, E., y Kent, M. (2015). *Veterinary neuroanatomy and clinical neurology* (4ª ed.). St. Louis: Elsevier.
- De Lahunta, A., Glass, E, y Kent, M. (2016). Embryonic Development of the Central Nervous System. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, 46(2), 193–216.
- Dewey, C. W., Brunke, M. W., y Sakovitch, K. (2022). Transcranial photobiomodulation (laser) therapy for cognitive impairment: A review of molecular mechanisms and potential application to canine cognitive dysfunction (CCD). *Open veterinary journal*, 12(2), 256–263.
- Dewey, C.W., y da Costa, R.C. (2016). Myelopathies: Disorders of Spinal Cord. En *Practical Guide to Canine and Feline Neurology*. (3ª ed., pp.328–404). Chichester: Wiley Blackwell.
- Dominici, M., Le Blanc, K., Mueller, I., Slaper-Cortenbach, I., Marini, F., Krause, D., ... Horwitz, E. (2006). Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*, 8(4), 315–317.
- Fang, W., y Nasir, Y. (2021). The effect of curcumin supplementation on recovery following exercise-induced muscle damage and delayed-onset muscle soreness: A systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Phytotherapy Research*, 35(4), 1768–1781.
- Farivar, S., Malekshahi, T., y Shiari, R. (2014). Biological effects of low level laser therapy. *Journal of Lasers in Medical Sciences*, 5(2), 58–62.
- Farley A, Johnstone C, Hendry C, y McLafferty, E. (2014). Nervous system: part 1. *Nursing Standard*, 28(31), 46–51.
- Fernández, M., Espejo, F., Rodríguez, C., Coates, J. R., Perez, C., De Lago, E., y Fernández, J. (2017). Upregulation of CB2 receptors in reactive astrocytes in canine degenerative myelopathy, a disease model of amyotrophic lateral sclerosis. *Disease Models & Mechanism*, 10(5), 551–558.
- Fletcher, T. (2013) Spinal cord and meninges. En H. Evans y A. De Lahunta, *Miller's Anatomy of the Dog*. (4ª ed, pp. 589-610). St Louis: Elsevier.
- Fleming, J.M., Creevy, K.E., y Promislow, D.E.L. (2011). Mortality in north american dogs from 1984 to 2004: an investigation into age-, size-, and breed-related causes of death. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 25(2), 187-198.
- Fluehmann, G., Doherr, M.G., y Jaggy A. (2006) Canine neurological diseases in a referral hospital population between 1989 and 2000 in Switzerland. *The Journal of Small Animal Practice*, 47(10), 582-587.
- Gaitero, L., Russell, S.J., Monteith, G., y LaMarre, J. (2016). Expression of microRNAs miR-21 and miR-181c in cerebrospinal fluid and serum in canine

- meningoencephalomyelitis of unknown origin. *The Veterinary Journal*, 216(2016), 122-124.
- Garosi L. (2008) El examen neurológico. En: Platt S, Olby N. *Manual de neurología de pequeños animales* (pp. 1-29). España: Ediciones S.
- Giacoppo, S., y Mazzon, E. (2016). Can cannabinoids be a potential therapeutic tool in amyotrophic lateral sclerosis? *Neural Regeneration Research*, 11(12), 1896-1899.
- Golubczyk, D., Malysz-Cymborska, I., Kalkowski, L., Janowski, M., Coates, J. R., Wojtkiewicz, J., ... Walczak, P. (2019). The Role of Glia in Canine Degenerative Myelopathy: Relevance to Human Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Molecular Neurobiology*, 56(8), 5740–5748.
- Goutman, S. A., Savelieff, M. G., Sakowski, S. A., y Feldman, E. L. (2019). Stem cell treatments for amyotrophic lateral sclerosis: a critical overview of early phase trials. *Expert opinion on investigational drugs*, 28(6), 525–543.
- Griffiths, I. R., y Duncan, I. D. (1975). Chronic degenerative radiculomyelopathy in the dog. *The Journal of Small Animal Practice*, 16(8), 461–471.
- Hacke, A., Lima, D., De Costa, F., Deshmukh, K., Li, N., Chow, A. M., Marques, J.A., ... Kerman, K. (2019). Probing the antioxidant activity of Δ9-tetrahydrocannabinol and cannabidiol in Cannabis sativa extracts. *Analyst*, 144(16), 4952-4961.
- Hartsel, J., Boyar, K., Pham, A., Silver, R.J., y Makriyannis, A. (2019). Cannabis in Veterinary Medicine: Cannabinoid Therapies for Animals. *Nutraceuticals in Veterinary Medicine*, 278(7434), 121-155.
- Holder, A. L., Price, J. A., Adams, J. P., Volk, H. A., y Catchpole, B. (2014). A retrospective study of the prevalence of the canine degenerative myelopathy associated superoxide dismutase 1 mutation (SOD1:c.118G > A) in a referral population of German Shepherd dogs from the UK. *Canine genetics and epidemiology*, 1, 10.
- Ibarburu, S. (2017). Neuroinflamación en un modelo de trasplante intraespinal de células gliales aberrantes que sobre-expresan la hSOD1G93A (Tesis de maestría). Facultad de Ciencias de UdelaR, Uruguay.
- Ivansson, E. L., Megquier, K., Kozyrev, S. V., Murén, E., Körberg, I. B., Swofford, R., ... Lindblad-Toh, K. (2016). Variants within the SP110 nuclear body protein modify risk of canine degenerative myelopathy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 113(22), E3091–E3100
- Jackson, M., Marks, L., May, G., y Wilson, J. B. (2018). The genetic basis of disease. *Essays in biochemistry*, 62(5). 643–723.
- Jeffery, N. D., Levine, J. M., Olby, N. J., y Stein, V. M. (2013). Intervertebral disk degeneration in dogs: Consequences, diagnosis, treatment, and future directions. *Journal of Veterinary Internal Medicine*. 27 (6). 1318-1333.
- Johnson, P. J., Miller, A. D., Cheetham, J., Demeter, E. A., Luh, W. M., Loftus, J. P., ... y Barry, E. F. (2021). In vivo detection of microstructural spinal cord lesions in dogs with degenerative myelopathy using diffusion tensor imaging. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 35(1), 352–362.

- Kanazono, S., Pithua, P., Johnson, G.C., Gilliam, S.N., Johnson, G.S., O'Brien, D.P., y Coates, J.R. (2013). Clinical progression of Canine Degenerative Myelopathy. En ACVIM FORUM (Ed.), (673-674). Seattle: *Journal of Veterinary Internal Medicine*.
- Kathmann, I., Cizinauskas, S., Doherr, M.G., Steffen, F., y Jaggy, A. Daily controlled physiotherapy increases survival time in dogs with suspected degenerative myelopathy. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 20(4), 927-932.
- Katz, M. L., Tecedor, L., Chen, Y., Williamson, B. G., Lysenko, E., Winger, F. A., ... y Davidson, B. L. (2015). AAV gene transfer delays disease onset in a TPP1-deficient canine model of the late infantile form of Batten disease. *Science translational medicine*, 7(313), 313ra180.
- Katz, M.L., Jensen, C.A., Student, J.T., Johnson, G.C., y Coates, J.R. (2017). Cervical spinal cord and motor unit pathology in a canine model of SOD1-associated amyotrophic lateral sclerosis. *Journal of the Neurological Sciences*, 378,193-203.
- Kimura, S., Kamatari, Y. O., Kuwahara, Y., Hara, H., Yamato, O., Maeda, ... y Honda, R. (2020). Canine SOD1 harboring E40K or T18S mutations promotes protein aggregation without reducing the global structural stability. *PeerJ*, 8, e9512.
- Klos, T. B., Coldebella, F., y Jandrey, F. C. (2020). Fisioterapia e reabilitação animal na medicina veterinária. *Pubvet*, 14, 148.
- Kobatake, Y., Sakai, H., Tsukui, T., Yamato, O., Kohyama, M., Sasaki, J., ... y Kamishina, H. (2017). Localization of a mutant SOD1 protein in E40K-heterozygous dogs: Implications for non-cell-autonomous pathogenesis of degenerative myelopathy. *Journal of Neurological Science*, 372, 369-378.
- Kobatake, Y., Nakata, K., Sakai, H., Sasaki, J., Yamato, O., Takashima, S., ... y Kamishina, H. (2021). The Long-Term Clinical Course of Canine Degenerative Myelopathy and Therapeutic Potential of Curcumin. *Veterinary sciences*, 8(9), 192. 1-10
- Lewis, M. L., Shomper, J.L., Baye, G.W., Vansteenkiste, D. P., Bibi, K. F., Lim, S. H. Y., ... y Coates, J. R. (2021). Brain diffusion tensor imaging in dogs with degenerative myelopathy. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 35, 2342–2349.
- Lorenz, M., Coates, J., y Kent, M. (2011). Handbook of Veterinary Neurology (5ªed.). St. Louis: Elsevier/Saunders.
- Lorenz M, Kornegay J. (2005). Handbook of Veterinary Neurology (4ª ed.). St. Louis: Elsevier/Saunders.
- Malysz-Cymborska, I., Golubczyk, D., Kalkowski, L., Kwiatkowska, J., Zawadzki, M., Głodek, J., ... y Janowski, M. (2021). Intra-arterial transplantation of stem cells in large animals as a minimally-invasive strategy for the treatment of disseminated neurodegeneration. *Scientific reports*, 11(6581), 1-10.
- Mandrioli, L., Gandini, G., Gentilini, F., Chiocchetti, R., Turba, M.E., Avallone, G., ... y Cantile, C. (2021). Degenerative Myelopathy in Hovawart Dogs: Molecular Characterization, Pathological Features and Accumulation of Mutant Superoxide Dismutase 1 Protein. *Journal of Comparative Pathology*, 182, 37-42.

- Mañas-García, L.; Bargalló, N.; Gea, J.; y Barreiro, E. (2020). Muscle phenotype, proteolysis, and atrophy signaling during reloading in mice: Effects of curcumin on the gastrocnemius. *Nutrients*, 12(2), 388.
- Marioni-Henry, K., Zaho, D., Amengual-Batle, P., Rzechorzek, N. M., y Clinton, M. Expression of microRNAs in cerebrospinal fluid of dogs with central nervous system disease (2018). *Acta Veterinaria Scandinavica*, 60(1), 1-6.
- Márquez, L. M, Serrato, A., y Cerritos, R. (2013). Secuenciación de fragmentos de ADN. En: Cornejo, A., Serrato, A., Rendón B., y Rocha, M. G., *Herramientas moleculares aplicadas en ecología: aspectos teóricos y prácticos* (pp. 231-249). México: UAM-I, INECC, Semarnat.
- Masrori, P., y Van Damme, P. (2020). Amyotrophic lateral sclerosis: a clinical review. *European journal of neurology*, 27(10), 1918–1929.
- Meyer, T., Funke, A., Münch, C., Kettemann, D., Maier, A., Walter, B., ... y Spittel, S. (2019). Real world experience of patients with amyotrophic lateral sclerosis (ALS) in the treatment of spasticity using tetrahydrocannabinol: cannabidiol THC:CBD. *BMC Neurology*, 19(1), 1-13.
- Meza, K. F., Valle, D., Pedraza, G., y Pérez, L. (2012). Role of microRNAs in central nervous system development and pathology. *Journal of Neuroscience Research*, 90(1), 1-12.
- Miller, L.A., Torraca, D., y de Taboada, L. (2020). Retrospective Observational Study and Analysis of Two Different Photobiomodulation Therapy Protocols Combined with Rehabilitation Therapy as Therapeutic Interventions for Canine Degenerative Myelopathy. *Photobiomodulation, Photomedicine, Laser Surgery*. 38(4), 195–205.
- Millis, D., y Ciuperca, I. (2015). Evidence for Canine Rehabilitation and Physical Therapy. *Veterinary Clinics of North America. Small Animal Practice*, 45(1), 1-27.
- Mondino, A., Piaggio, J., Loureiro, C., Vasconcellos, R., y Delucchi, L. (2015). Efecto de la raza, sexo y edad en la presentación de enfermedades del sistema nervioso central en caninos atendidos en el Hospital de la Facultad de Veterinaria de Uruguay. *Veterinaria (Montevideo)*, 51 (199), 4-4.
- Mondino A, Sosa S, Santiestéban R, y Bentancurt J. (2020). Potencialidad del Cannabis en el tratamiento de la disfunción cognitiva canina. *REMEVET*, 2020(1), 7-9.
- Moreno, M., Espejo, F., Fernández, J., y De Lago, E. (2014). Changes in endocannabinoid receptors and enzymes in the spinal cord of sod1g93a transgenic mice and evaluation of a sativex® like combination of phytocannabinoids: Interest for future therapies in amyotrophic lateral sclerosis. *CNS neuroscience & therapeutics*, 20(9), 809–815.
- Morgan, B. R., Coates, J. R, Johnson, G. C., Shelton, G. D., y Katz, M. L. (2014). Characterization of thoracic motor and sensory neurons and spinal nerve roots in canine degenerative myelopathy, a potential disease model of amyotrophic lateral sclerosis. *Journal of Neuroscience Research*, 92(4), 531-541.
- Mueller, C., Berry, J.D., McKenna-Yasek, D.M., Gernoux, G., Owegi, M.A., Pothier, L.M., ... y Brown, R. H. (2020). *SOD1*

- Suppression with Adeno-Associated Virus and MicroRNA in Familial ALS. *The New England Journal of Medicine*, 383(2), 151-158.
- Nakamae, S., Kobatake, Y., Suzuki, R., Tsukui, T., Kato, S., Yamato, O., ... y Kamishina, H. (2015). Accumulation and aggregate formation of mutant superoxide dismutase 1 in canine degenerative myelopathy. *Neuroscience*, 303(2015), 229–240.
- Nakata, K., Heishima, K., Sakai, H., Yamato, O., Furusawa, Y., Nishida, H., ... y Kamishina, H. (2019). Plasma microRNA miR-26b as a potential diagnostic biomarker of degenerative myelopathy in Pembroke welsh corgis. *BMC Veterinary Research*, 15(1), 1-9.
- Nardone, R., Höller, Y., Taylor, A. C., Lochner, P., Tezzon, F., Golaszewski, S., ... y Trinka, E. (2016). Canine degenerative myelopathy: A model of human amyotrophic lateral sclerosis. *Zoology*, 119(1), 64–73.
- Nayak, M.S., Kim, Y.S., Goldman, M., Keirstead, H.S., y Kerr, D.A. (2006). Cellular therapies in motor neuron diseases. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1762(11-12), 1128–1138.
- Neeves J, y Granger N. (2015). An update on degenerative myelopathy in dogs. *Companion Animal*, 20(7), 408–412.
- Nussbaum, R.L., McInnes, R., Willard H.F., y Amosh A. (2016). *Thompson & Thompson Genetics in Medicine* (8^a ed.). Philadelphia: Elsevier.
- Olby, N. J., Lim, J. H., Wagner, N., Zidan, N., Early, P. J., Mariani, C. L., ... y Laber, E. (2019). Time course and prognostic value of serum GFAP, pNFH, and S100 β concentrations in dogs with complete spinal cord injury because of intervertebral disc extrusion. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 33(2), 726-734.
- Oliveira, S., Krüger, W., Pinto, E., Gianotti, G., y Contesini, E. (2012). Tratamento por acupuntura em um Pastor Belga com Mielopatia Degenerativa. *Archivos de Medicina Veterinaria*, 17(071), 215–218.
- O'Neill, D.G., Church, D.B., McGreevy, P.D., Thomson, P.C., y Brodbelt, D.C. (2013). Longevity and mortality of owned dogs in England, *The Veterinary Journal*, 198(3), 638-643.
- Online Mendelian Inheritance in Animals (OMIA). Sydney School of Veterinary Science, University of Sydney. MIA Number: OMIA 000263: 20 de junio de 2022. World Wide Web URL: <https://omia.org/OMIA000263/9615/>
- Online Mendelian Inheritance in Animals, OMIA. Sydney School of Veterinary Science, {23/06/22}. World Wide Web URL: <https://omia.org/home/>
- Ogawa, M., Uchida, K., Yamato, O., Inaba, M., Uddin, M., y Nakayama, H. (2014). Neuronal Loss and Decreased GLT-1 Expression Observed in the Spinal Cord of Pembroke Welsh Corgi Dogs With Canine Degenerative Myelopathy. *Veterinary Pathology*, 51(3), 591-602.
- Panek, W.K, Gruen, M. E., Murdoch, D. M., Marek, R.D., Stachel, A.F., Mowat, F. M., ... y Olby, N.J. (2020). Plasma Neurofilament Light Chain as a Translational Biomarker of Aging and Neurodegeneration in Dogs. *Molecular Neurobiology*, 57(7), 3143-3149.

- Platt, S. (2010). *Atlas and Textbook of Small Animal Neurology* (2^a. Ed). Hannover: Schlütersche.
- Pellegrino, F.C. (2013). Mielopatía degenerativa: estado actual del conocimiento. Revisión bibliográfica. *Anales de Veterinaria de Murcia*, 29(2013), 63-86.
- Pellegrino, F.C., Pacheco, E.L., y Vazzoler, M.L. (2011). Caracterización de los trastornos neurológicos en los perros: 1652 casos (marzo 2008 - junio 2010) Parte 1. *Revista Argentina de Neurología Veterinaria*, 2(1), 78-96.
- Pena, S. A., Iyengar, R., Eshraghi, R. S., Bencie, N., Mittal, J., Aljohani, A., ... y Eshraghi, A. A. (2020). Gene therapy for neurological disorders: challenges and recent advancements. *Journal of Drug Targeting*, 28(2), 111–128.
- Pertwee R. G. (2012). Targeting the endocannabinoid system with cannabinoid receptor agonists: pharmacological strategies and therapeutic possibilities. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*, 367(1607), 3353–3363.
- Pinto, J. G. (2016). Nanopartículas de curcumina: Estrategias y aplicaciones. *MoleQla: revista de Ciencias de la Universidad Pablo de Olavide*, (23), 4.
- Polizopoulou, Z.S., Koutinas, A.F., Patsikas, M.N., y Soubasis, N. (2008). Evaluation of a proposed therapeutic protocol in 12 dogs with tentative degenerative myelopathy. *Acta Veterinaria Hungarica*, 56(3), 293-301.
- Pryor, B., y Millis, D. L. (2015). Therapeutic laser in veterinary medicine. *The Veterinary clinics of North America. Small animal practice*, 45(1), 45–56
- Rajewski, G. (2017). Fighting Canine ALS. Recuperado de <https://now.tufts.edu/articles/fighting-canine-als>.
- Russo, E., y Guy, G. W. (2006). A tale of two cannabinoids: The therapeutic rationale for combining tetrahydrocannabinol and cannabidiol. *Medical Hypotheses*, 66(2), 234-246.
- Ruozzi B., Belletti, D., Bondioli, L., De Vita, A., Forni, F., Vandelli, M.A., y Tosi, G. (2012). Neurotrophic Factors and Neurodegenerative Diseases: A Delivery Issue. *International Review of Neurobiology*, 102, 207-247.
- Sandrock, R. W., Wheatley, W., Levinthal, C., Lawson, J., Hashimoto, B., Rao, M., y Campanelli, J. T. (2010). Isolation, characterization and preclinical development of human glial-restricted progenitor cells for treatment of neurological disorders. *Regenerative Medicine*, 5(3), 381–394.
- Santos, C., Gouveia, J., Gouveia, G. V., Bezerra, F., Nogueira, J. F., y Baraúna Júnior, D. (2020). Molecular screening for the mutation associated with canine degenerative myelopathy (SOD1:c.118G > A) in German Shepherd dogs in Brazil. *Public Library of Science One*, 15(11), e0242347
- Scotter, E., Abood, M., y Glass, M. (2010). The endocannabinoid system as a target for the treatment of neurodegenerative disease. *British Journal of Pharmacology*, 160(3), 480-498.
- Schönthal A. H. (2012). Endoplasmic reticulum stress: its role in disease and novel prospects for therapy. *Scientifica*, 2012.
- Shelton, G. D., Johnson, G. C., O'Brien, D. P., Katz, M. L., Pesayco, J. P., Chang, B. J., ... y Coates, J. R. (2012). Degenerative myelopathy associated with a

- missense mutation in the superoxide dismutase 1 (SOD1) gene progresses to peripheral neuropathy in Pembroke Welsh corgis and boxers. *Journal of the Neurological Sciences*, 318(1-2), 55–64.
- Smith, R.A., Miller, T.M., Yamanaka, K., Monia, B.P., Condon, T.P., Hung, G., ... y Cleveland, D.W., 2006. Antisense oligonucleotide therapy for neurodegenerative disease. *The Journal of Clinical Investigation*, 116(8), 2290-2296.
- Story, B. D., Miller, M. E., Bradbury, A. M., Million, E. D., Duan, D., Taghian, T., ... y Gray-Edwards, H. L. (2020). Canine Models of Inherited Musculoskeletal and Neurodegenerative Diseases. *Frontiers in veterinary science*, 7(80), 1–21.
- Suero, C., Martín, L., y Holgado, M. A. (2015). Efecto neuroprotector de los cannabinoides en las enfermedades neurodegenerativas. *Ars Pharmaceutica (Internet)*, 56(2), 77-87.
- Šulla, I., Balik, V., Horňák, S., y Ledecký, V. (2018). Spinal Cord Injuries in Dogs Part I: A Review of Basic Knowledge. *Folia Veterinaria*, 62(2), 35–44.
- Suraniti, A.P., Gilardoni, L.R., Mira, G., Fidanza, M., Guerrero, J., Marina, M.L., ... y Mercado, M. (2011). Mielopatía Degenerativa canina: signos clínicos, diagnóstico y terapéutica. *REDVET*, 12(8),1-9.
- Swain, G., Prociuk, M., Bagel, J., O' Donnell, P., Berger, K., Drobotz, K., ... y Vite, C. H. (2014). Adeno-associated virus serotypes 9 and rh10 mediate strong neuronal transduction of the dog brain. *Gene Ther*, 21, 28–36.
- Toedebusch, C. M., Bachrach, M. D., Garcia, V. B., Johnson, G. C., Katz, M. L., Shaw, G., ... y Garcia, M. L. (2017). Cerebrospinal Fluid Levels of Phosphorylated Neurofilament Heavy as a Diagnostic Marker of Canine Degenerative Myelopathy. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 31(2), 513-520.
- Tovar-Y-Romo, L. B., Ramírez-Jarquín, U. N., Lazo-Gómez, R., y Tapia, R. (2014). Trophic factors as modulators of motor neuron physiology and survival: implications for ALS therapy. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 8, 61.
- Urbi, B., Owusu, M. A., Hughes, I., Katz, M., Broadley, S., y Sabet, A. (2019). Effects of cannabinoids in Amyotrophic Lateral Sclerosis (ALS) murine models: a systematic review and meta-analysis. *Journal of Neurochemistry*, 149(2), 284–297.
- Vansteenkiste, D. P, Fenger, J. M, Fadda, P., Martin, P., y da Costa, R. C. (2019). MicroRNA expression in the cerebrospinal fluid of dogs with and without cervical spondylomyelopathy. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 33(6), 2685-2692.
- Webb, A., Ngan, S., y Fowler, D. (2010). Spinal cord injury II: Prognostic indicators, standards of care, and clinical trials. *Canadian Veterinary Journal*, 51(6), 598 – 604.
- Whiting, R., Jensen, C. A., Pearce, J. W., Gillespie, L. E., Bristow, D. E., y Katz, M. L. (2016). Intracerebroventricular gene therapy that delays neurological disease progression is associated with selective preservation of retinal ganglion cells in a canine model of CLN2 disease. *Experimental Eye Research*, 146, 276–282.
- Winger, F.A., Zeng, R., Johnson, G.S., Katz, M.L., Johnson, G.C., Bush, W.W., ... y Coates, J. R. (2011). Degenerative Myelopathy in a Bernese Mountain Dog with

- a Novel SOD 1 Missense Mutation. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 25 (5), 1166–1170.
- Xie, H., Dewey, C.W., Pi, M.D., y Cao, G. (2018). Traditional Chinese Veterinary Medicine for Degenerative Myelopathy in Dogs TCVM Traditional Chinese veterinary medicine. *American Journal of Traditional Chinese Veterinary Medicine*, 13(2), 57–64.
- Yan Y., Jensen K., y Brown A. (2007). The polypeptide composition of moving and stationary neurofilaments in cultured sympathetic neurons. *Cell Motility and the Cytoskeleton*, 64(4), 299–309
- Yokota, S., Kobatake, Y., Noda, Y., Nakata, K., Yamato, O., Hara, H., ... y Kamishina, H. (2018). Activation of the unfolded protein response in canine degenerative myelopathy. *Neuroscience Letters*, 687(3), 216–222.
- Zeiler, G.E., Van der Zwan, H., y Oosthuizen, M.C. (2013). Genetic testing of canine degenerative myelopathy in the South African Boxer dog population. *Journal of the South African Veterinary Association*, 84(1), 1-5.
- Zeira, O., Asiag, N., Aralla, M., Ghezzi, E., Pettinari, L., Martinelli, L., y Cantile, C. (2015). Adult autologous mesenchymal stem cells for the treatment of suspected non-infectious inflammatory diseases of the canine central nervous system: safety, feasibility and preliminary clinical findings. *Journal of neuroinflammation*, 12, 181.
- Zeng, R., Coates, J. R., Johnson, G. C., Hansen, L., Awano, T., Kolicheski, A., ... y Johnson, G. S. (2014). Breed distribution of SOD1 alleles previously associated with canine degenerative myelopathy. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 28 (2), 515-521.