

**UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA
FACULTAD DE VETERINARIA**

**ANÁLISIS DE POLIMORFISMOS EN EL GEN ARSG ASOCIADO A LA
ABIOTROFIA CEREBELAR EN CANINOS PIT BULL TERRIER DE
URUGUAY**

por

Carolina Paola MENCHACA BILLECI

TESIS DE GRADO presentada como uno de
los requisitos para obtener el título de Doctor
en Ciencias Veterinarias
Orientación: Medicina Veterinaria

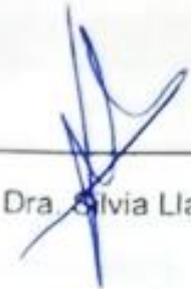
MODALIDAD: Estudio Poblacional

**MONTEVIDEO
URUGUAY
2024**

PÁGINA DE APROBACIÓN

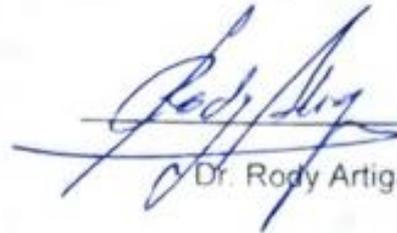
Tesis de grado aprobada por:

Presidente de Mesa



Dra. Silvia Llambi

Segundo miembro (Tutor):



Dr. Rody Artigas

Tercer miembro:



Dra. Clarisa Brighenti

Cuarto Miembro (Co-Tutor):



Dra. Alejandra Mondino

Fecha:

02-08-2024

Autor:



Br. Carolina Menchaca

AGRADECIMIENTOS

Quisiera agradecer, en primer lugar, a mis tutores Rody y Ale, quienes han sido mis guías en este último tramo de la carrera. Su dedicación, paciencia y apoyo constante en la realización de este trabajo han sido fundamentales. Gracias por siempre motivarme, confiar en mí y ayudarme a crecer como profesional.

A mi querida Facultad de Veterinaria, por permitirme formarme a lo largo de todos estos años de carrera. Agradezco a los docentes, funcionarios y compañeros que me han acompañado en este camino.

A mis padres, mi hermano y Nacho, quienes son un pilar fundamental en mi vida. Gracias por ser sostén, creer en mí y acompañar este proceso con paciencia y amor. Gracias por siempre impulsarme a crecer y permitirme seguir mi vocación.

A mis tías Adriana, Elena y Claudia, por estar siempre presentes, saber escucharme e impulsarme a seguir adelante. Su apoyo y cariño han sido invaluableles durante estos años.

A mis amigas, tanto las de toda la vida como me dió la facultad, por estar incondicionalmente en cada paso de este camino. Gracias por celebrar cada logro, por estar en los momentos difíciles y por nunca permitirme rendirme. Sin ustedes esto no habría sido posible.

Por último, a cada uno de los animales que se atravesaron en mi vida, en especial a Roy e India, por ser una fuente constante de inspiración y motivación en mi formación como veterinaria. Gracias por ser parte esencial de mi vida y recordarme cada día por qué elegí esta noble profesión.

TABLA DE CONTENIDOS

	Página
PÁGINA DE APROBACIÓN.....	2
AGRADECIMIENTOS.....	3
TABLA DE CONTENIDOS.....	4
LISTA DE FIGURAS.....	5
LISTA DE TABLAS	6
RESUMEN	7
SUMMARY	8
1. INTRODUCCIÓN	9
2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	11
2.1 El cerebelo	11
2.2 Patologías que afectan el cerebelo en caninos.....	15
2.2.1 Degeneraciones corticales cerebelosas.....	17
2.2.2 Degeneración Espinocerebelosa	20
2.2.3 Ataxias Cerebelosa sin Neurodegeneración Severa	22
2.2.4 Degeneración Multisistémica Canina	23
2.2.5 Ataxia episódica	24
2.2.6 Degeneración multifocal con predominio (espino) cerebelar.....	24
2.2.6.1 Lipofuscinosis neuronal cerioidea 4A en Staffordshire y Pit Bull Terriers	25
3. HIPÓTESIS	30
4. OBJETIVOS	30
4.1 Objetivo general	30
4.2 Objetivo específico	30
5. MATERIALES Y MÉTODOS	31
6. RESULTADOS.....	34
7. DISCUSIÓN.....	38
8. CONCLUSIONES	42
9. BIBLIOGRAFÍA	43

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1: Vista del corte longitudinal del cerebro normal del perro.	12
Figura 2: Anatomía del cerebelo canino.	12
Figura 3: Sección transversal del cerebelo y la médula oblonga canina.	13
Figura 4: División funcional del cerebelo.	15
Figura 5: Electroforesis en gel de agarosa al 1,5% de los productos de PCR para la mutación responsable de la AC en el gen ARSG.	34
Figura 6: Electroferograma correspondientes a animales GG, GA, y AA, respectivamente. La flecha indica el sitio de la mutación.	34
Figura 7: Representación gráfica del Score AMYCO, representando la propensión amiloide de la mutación ARSG:c.296G>A.	36
Figura 8: Puentes de hidrógeno de la proteína ARSG.	36
Figura 9: Efecto de la sustitución del aminoácido ARG99 por HIS99 en el potencial electrostático de la proteína ARSG.	37

LISTA DE TABLAS

	Página
Tabla 1: Degeneración corticales cerebelosas en diversas razas caninas que poseen variante genética conocida o región de interés identificada.	18
Tabla 2: Degeneración corticales cerebelosas en diversas razas caninas sin variante genética conocida o región de interés identificada.	19
Tabla 3: Degeneración espinocerebelosa en diversas razas caninas que poseen una variante genética conocida.	21
Tabla 4: Variantes genética conocidas asociada al desarrollo de ataxias cerebelosa sin neurodegeneración severa en caninos.	22
Tabla 5: Variantes génicas reportadas asociada con la degeneración multisistémica canina	23
Tabla 6: Variantes génicas reportadas asociadas a la degeneración multifocal con predominio (espino) cerebelar	25
Tabla 7. Frecuencia genotípica para la mutación en el gen ARSG asociada a la abiotrofia cerebelar en el Pit Bull Terrier del Uruguay.	35
Tabla 8. Análisis Meta-SNP: meta-predictor de variantes causantes de enfermedad.	35

RESUMEN

La abiotrofia cerebelar (AC) es una enfermedad neurodegenerativa hereditaria que afecta el cerebelo y cursa clínicamente con ataxia. Se ha determinado la mutación ARSG:c.296G>A en el gen que codifica para la enzima lisosomal Arilsulfatasa G como causa subyacente de esta enfermedad en caninos Pit Bull Terrier. Los animales homocigotas AA se encuentran en riesgo de desarrollar la enfermedad. Este estudio tiene como objetivo determinar de forma preliminar la frecuencia alélica y genética de la mutación ARSG:c.296G>A en una muestra poblacional representativa de Pit Bull Terriers de Uruguay mediante el uso de la técnica de secuenciación de productos de reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Se genotiparon 30 animales no relacionados, obteniéndose una frecuencia genotípica observada de 0,77, 0,17, 0,07 para los genotipos "GG", "AG" y "AA", respectivamente. La frecuencia del alelo mutante (A) fue 0,15 mientras que el alelo normal (G) fue de 0,85. Se demostró por primera vez en Uruguay la evidencia molecular de la presencia de la mutación ARSG:c.296G>A en caninos Pit Bull Terrier. Los resultados constituyen datos epidemiológicos importantes acerca de la posible diseminación de la enfermedad.

SUMMARY

Cerebellar abiotrophy is a hereditary neurodegenerative disease that affects the cerebellum and clinically manifests with ataxia. The ARSG:c.296G>A mutation in the gene encoding the lysosomal enzyme Arylsulfatase G has been identified as the underlying cause of this disease in Pit Bull Terriers. Animals that are homozygous AA are at risk of developing the disease. This study aims to preliminarily determine the allelic and genetic frequency of the ARSG:c.296G>A mutation in a representative population sample of Pit Bull Terriers from Uruguay using the polymerase chain reaction (PCR) product sequencing technique. Thirty unrelated animals were genotyped, obtaining an observed genotypic frequency of 0,77, 0,17, 0,07 for the genotypes "GG", "AG" and "AA", respectively. The frequency of the mutant allele (A) was 0,15 while the normal allele (G) was 0,85. This study provides the first molecular evidence of the presence of the ARSG:c.296G>A mutation in Pit Bull Terriers in Uruguay. The results provide important epidemiological data regarding the possible spread of the disease.

1. INTRODUCCIÓN

La abiotrofia cerebelar (AC) es un término que hace referencia a numerosas enfermedades neurodegenerativas que afectan el cerebelo y que cursan clínicamente con ataxia (Pellegrino, 2020). Estas enfermedades se caracterizan por la degeneración neuronal prematura, progresiva e irreversible producto de un defecto metabólico intrínseco hereditario (Sisó et al., 2006). La AC afecta numerosas especies, entre ellas los caninos, donde su presentación clínica varía según la raza afectada (Scott, Woolard, Finno y Murray, 2018).

Se ha descrito una variante de inicio tardío en caninos de raza American Staffordshire Terrier, American Pit Bull Terrier y sus respectivos cruzamientos. En estos animales, la edad de aparición de los primeros signos es entre los 4-6 años y el curso es inexorablemente progresivo (Agler et al., 2014; Pellegrino, 2020; Urkasemsin y Olby, 2014). El cuadro clínico se caracteriza por ataxia, hipermetría, aumento de la base de sustentación, caídas tras sacudir la cabeza, temblores de intención, nistagmo espontáneo, entre otros. Generalmente, la AC progresa en un periodo de 2 a 4 años, hasta que el animal es incapaz de deambular, momento en el que los propietarios suelen optar por la eutanasia (Olby et al., 2004; Pellegrino, 2010; Verdes, Delucchi, Feijoó, Fumagali y Serpa, 2020). Hasta el momento no se ha descrito un protocolo terapéutico efectivo para la enfermedad por lo cual es de muy mal pronóstico (Pellegrino, 2010). El diagnóstico definitivo de la AC puede ser realizado únicamente mediante el estudio histopatológico postmortem a partir de muestras de tejido cerebelar (Olby et al., 2004).

Se ha demostrado que, en dichas razas, la enfermedad se debe a una mutación (ARSG:c.296G>A) en el gen *ARSG* que codifica para la enzima lisosomal Arilsulfatasa G (Abitbol et al., 2010). Los animales homocigota para el Alelo A mutante (AA) están en riesgo de desarrollar la enfermedad, aunque no todos ellos llegarán a padecerla debido a su carácter hereditario autosómico recesivo con penetrancia incompleta (Sisó et al., 2006). Dada la manifestación tardía de los signos clínicos de la AC sumado a que la fertilidad de los animales homocigotas mutantes no se ve afectada, es poco probable que la selección natural actúe sobre este gen permitiendo que la mutación se mantenga en la población (Abitbol et al., 2010; Olby et al., 2004).

En Uruguay, la enfermedad fue reportada por primera vez en el año 2020, en un canino American Staffordshire Terrier (Verdes et al., 2020), por lo que existe evidencia de que el alelo deletéreo se encuentra circulando en el territorio nacional. Sin embargo, no existen estudios disponibles que hayan comprobado molecularmente su presencia. Por ello, esta tesis de grado tiene como objetivo determinar de forma preliminar la frecuencia alélica y genotípica de la mutación ARSG:c.296G>A en caninos Pit Bull Terrier del Uruguay.

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1 El cerebelo

El cerebelo (del latín *cerebellum*, “pequeño cerebro”) es un órgano impar que forma parte del sistema nervioso central (SNC) de todos los vertebrados (Sultan y Glickstein, 2007). A pesar de que solo representa un 10% del volumen cerebral, el cerebelo contiene más de la mitad de las neuronas de todo el SNC, gracias a su disposición de finos pliegues altamente compactos (Dewey y da Costa, 2016; Scott et al., 2018). Desempeña un papel crucial en la coordinación motora, regulación de la postura y el equilibrio. Además, está implicado en varias funciones integrativas, como el procesamiento del comportamiento, la memoria, funciones de aprendizaje asociativo y el procesamiento nociceptivo (Dewey y da Costa, 2016). Conocer las bases neuroanatómicas de este órgano permite comprender las consecuencias de los procesos neurodegenerativos y cómo estos repercuten en la salud de los animales afectados.

El cerebelo se sitúa sobre el cuarto ventrículo, precisamente en la fosa posterior del hueso occipital del cráneo. Se localiza en posición dorsal con respecto al puente y la médula oblonga. Se comunica con el tronco encefálico por tres pares de pedúnculos (Klein, 2020).

Dicho órgano posee una forma ovóide levemente aplanado. Se compone de una porción central conocida como vermis (su aspecto se recuerda a la de un gusano) y a cada lado de este, se localizan los hemisferios cerebelosos. Se encuentra dividido por dos surcos transversales profundos: el surco primario y el posterolateral, de manera que se distinguen fácilmente tres regiones: el lóbulo anterior, posterior y floclonodular (de Lahunta y Glass, 2009).

Su superficie externa rugosa, se compone de láminas estrechas replegadas (denominadas “folias cerebelosas”), las cuales se orientan en forma transversal y son responsables del aspecto arborizado característico de este órgano (Acosta et al., 2018; de Lahunta y Glass, 2009; Sultan y Glickstein, 2007).

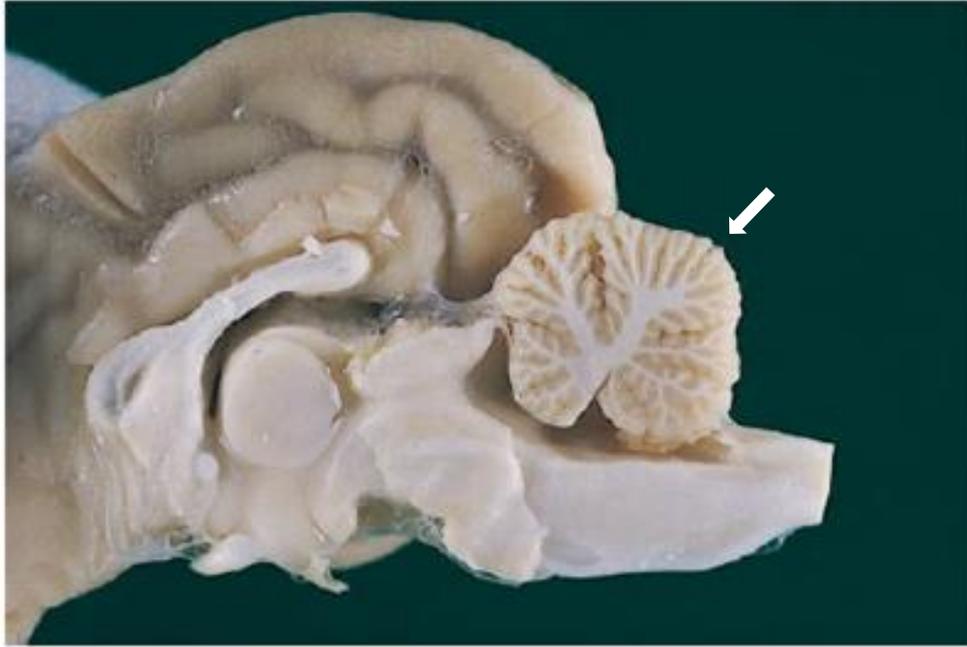


Figura 1: Vista del corte longitudinal del cerebro normal del perro. Se evidencia el aspecto típico “arborizado” que adoptan las folias compuestas por la sustancia blanca de la médula cerebelar (flecha). Modificado de: de Lahunta y Glass, (2009).

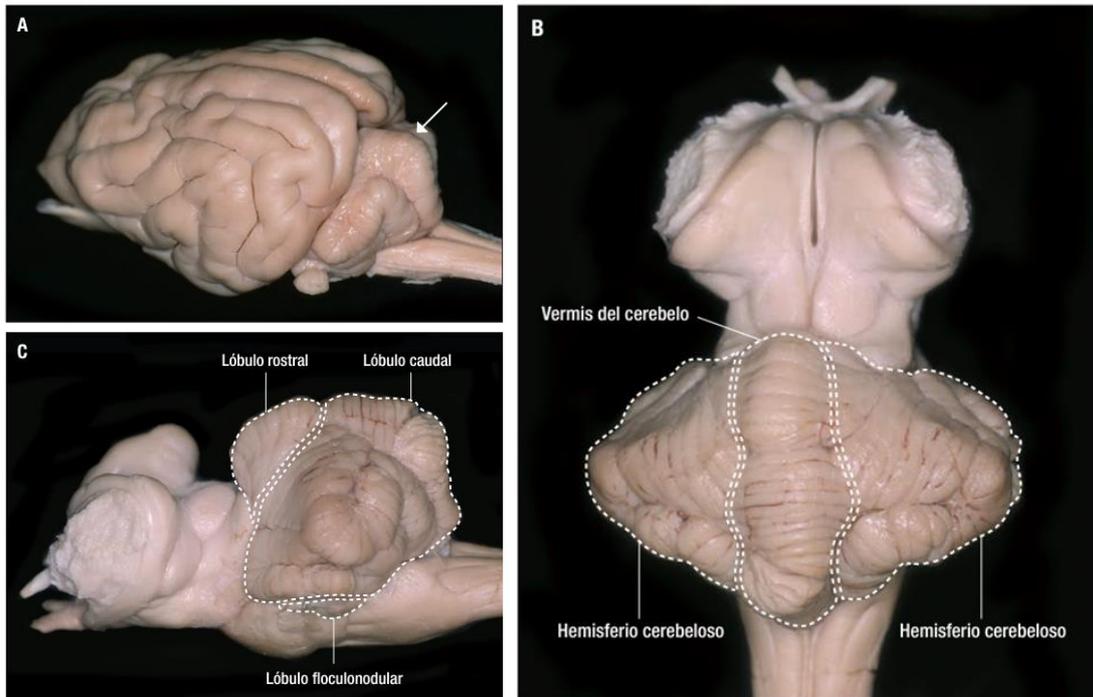


Figura 2: Anatomía del cerebelo canino. Imagen A, vista caudal del encéfalo canino donde se indica la posición del cerebelo (flecha). Imagen B y C obtenidas luego de retirar ambos hemisferios cerebrales. B, vista dorsal del vermis y hemisferios cerebelosos. C, vista lateral del cerebelo y tronco encefálico, lóbulo rostral, lóbulo caudal y lóbulo floculonodular. Extraído de Aige y Morales (2012).

Internamente, el cerebelo está formado por tres elementos principales: la corteza cerebelosa, los núcleos profundos y la sustancia blanca. La corteza cerebelosa, que constituye la capa más externa, está formada principalmente por materia gris. Situados por debajo se encuentran los núcleos cerebelares profundos: el núcleo dentado, el núcleo fastigial y el núcleo interposital. La sustancia blanca envuelve los núcleos profundos y está compuesta por fibras nerviosas mielinizadas que conectan la corteza con los núcleos profundos y otras regiones del sistema nervioso central (de Lahunta y Glass, 2009; Dewey y da Costa, 2016).

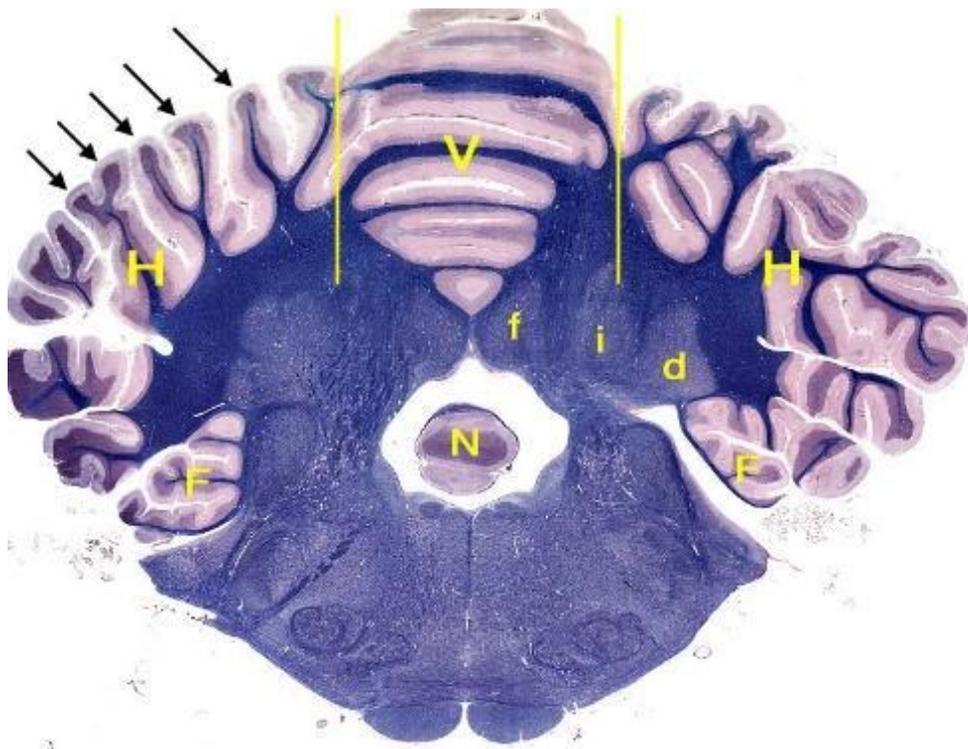


Figura 3: Sección transversal del cerebelo y la médula oblonga de un perro (tinción con azul de luxol y violeta de crisol). Las flechas indican las folias cerebelosas. Se identifican el vermis (V) y los hemisferios cerebelosos (H). El flóculo (F) y nódulo (N) que en conjunto forman el lóbulo floclonodular. Se observan tres núcleos cerebelosos: fastigial (f); interpositus (i); y dentate (d). Extraído de Fletcher y Beitz (2011), *Lab: Cerebellar Anatomy*, recuperado de <https://vanat.ahc.umn.edu/neurLab6/pages/CbellSectRegions.html> (23/07/24).

Asimismo, la corteza cerebelar está compuesta por tres capas histológicas uniformes en toda su extensión: la capa molecular, la capa más externa que contiene células en cesta y estrellas; la capa intermedia o de las células de

Purkinje, células con actividad inhibitoria y principal unidad funcional del cerebelo; y la capa granular que contiene las células de Golgi y células granulares (Acosta et al., 2018; Dewey y da Costa, 2016).

El cerebelo puede dividirse desde un punto de vista funcional en tres regiones: el vestibulocerebelo, espinocerebelo y cerebrocerebelo (de Lahunta y Glass, 2009).

1. El vestibulocerebelo: está conformado por el lóbulo floculonodular y el núcleo fastigial. Es el área responsable de controlar el equilibrio y la postura. Recibe información del sistema vestibular y es el encargado de coordinar el movimiento de los ojos y la cabeza (Dewey y da Costa, 2016).
2. El espinocerebelo: está compuesto por el vermis y la porción medial adyacente de los hemisferios cerebelosos. Recibe información somatosensitiva de la médula espinal y regula el tono muscular para producir movimientos suaves y coordinados (Dewey y da Costa, 2016).
3. El cerebrocerebelo: está localizado en las regiones laterales de los hemisferios cerebelosos y en asociación con el núcleo dentado, se encarga del movimiento de los miembros. Está asociado a la planificación y ejecución de movimientos voluntarios, así como el aprendizaje motor. Está involucrado en la preparación del movimiento determinando la dirección, sincronía y fuerza de los movimientos, información que es enviada a la corteza motora para su ejecución (Dewey y da Costa, 2016). También, interviene en funciones cognitivas no vinculadas directamente al movimiento (Klein, 2020).

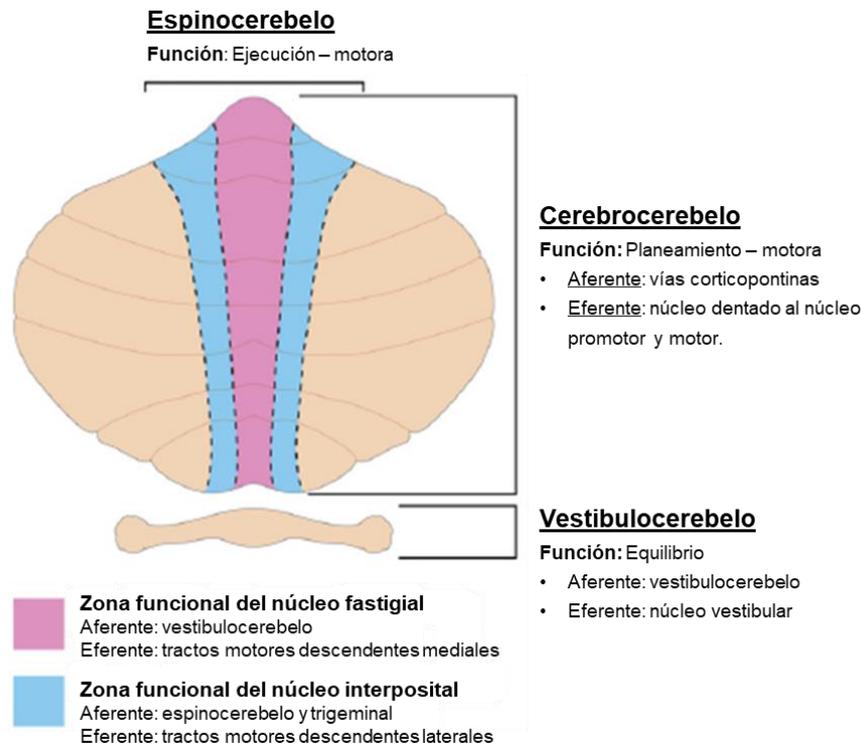


Figura 4: División funcional del cerebelo. Modificado de Dewey y da Costa, (2016).

2.2 Patologías que afectan el cerebelo en caninos

La mayoría de las enfermedades cerebelares primarias diagnosticadas en animales domésticos suelen ser de dos tipos: en primer lugar, congénitas, resultado de una infección viral intrauterina o, menos frecuentemente, un trastorno del desarrollo; y, en segundo lugar, enfermedades neurodegenerativas progresivas de carácter hereditario (de Lahunta y Glass, 2009).

En perros, las anomalías del desarrollo cerebelar, como la agenesia y la hipoplasia cerebelosa, son alteraciones poco frecuentes y no se ha podido determinar una posible causa etiológica. Pueden asociarse a cuadros clínicos no progresivos compatibles con un trastorno cerebelar difuso en cachorros de pocas semanas (de Lahunta y Glass, 2009). Hasta el momento, no se han determinado infecciones virales intrauterinas que afecten el desarrollo del cerebelo en esta especie. Sin embargo, en casos raros, si un cachorro en su primera semana de vida sobrevive a la infección causada por herpesvirus canino, podría desarrollar ataxia cerebelosa debido al daño ocasionado por el virus durante el desarrollo de este órgano (Percy, Carmicheal, Albert, King y Jonas 1971). Se ha reportado

una posible asociación entre la exposición al parvovirus canino y malformaciones cerebelares (Schatzberg et al, 2003).

La abiotrofia cerebelar es un síndrome posnatal común en perros, que causa un trastorno clínico progresivo, el cual generalmente comienza a las pocas semanas de edad en la mayoría de las razas afectadas (de Lahunta y Glass, 2009; Pellegrino, 2010).

Las abiotrofias cerebelares son un grupo de enfermedades neurodegenerativas de carácter hereditario que afectan la corteza del cerebelo y cursan clínicamente con ataxia (Scott et al., 2018). Por definición, “*abiotrofia*” significa “defecto de la sustancia nutricia vital” necesaria para el mantenimiento celular (de Lahunta, 1990; Summers, Cummings y de Lahunta, 1995; Sisó et al, 2006). Se asocia con la degeneración neuronal prematura como resultado de un daño metabólico intrínseco posterior a una diferenciación celular normal (de Lahunta y Glass, 2009; Scott et al., 2018).

Actualmente, se sabe que varias de las patologías contempladas bajo este término no tienen origen metabólico por lo que se prefiere denominarlas como “degeneraciones del cuerpo neuronal” o referirse a ellas como “ataxias hereditarias” asociado a su componente genético (Urkasemsin y Olby, 2014).

Estas enfermedades han sido reportadas en múltiples razas caninas, presentando diferentes edades de inicio y ritmos de progresión, así como diversas combinaciones de signos clínicos y localización de lesiones en el sistema nervioso central (SNC) (Stee et al., 2023). Debido a que incluye un grupo extenso y heterogéneo de enfermedades neurodegenerativas que afectan el cerebelo o espinocerebelo, su clasificación se ha vuelto todo un desafío (Stee et al., 2023; Urkasemsin y Olby, 2014).

Según *Urkasemsin y Olby, 2014*, pueden clasificarse de acuerdo a sus hallazgos neuropatológicos en: degeneraciones cerebelosas corticales (donde la degeneración se limita a la corteza cerebelar), degeneraciones espinocerebelosas (donde el daño se extiende hacia el bulbo raquídeo y médula espinal), degeneración multisistémica canina (donde también hay afectación de los núcleos olivares, la sustancia negra, el putamen y los núcleos caudados), ataxia cerebelosa sin neurodegeneración severa (donde existen signos de

disfunción cerebelosa sin alteraciones histopatológicas francas) y ataxia episódica (donde no hay daños histológicos severos y los individuos son neurológicamente normales entre episodios).

Basándose en la clasificación anterior, *Stee et al. (2023)*, incorpora una nueva categoría denominada "*degeneraciones multifocales con predominio del componente espinocerebeloso*", en la cual se incluyen algunas enfermedades específicas que provocan una disfunción espinocerebelosa y escapaban a la clasificación anterior.

2.2.1 Degeneraciones corticales cerebelosas

Las degeneraciones corticales cerebelosas (DCC) se consideran una de los procesos neurodegenerativos más frecuentes en animales (*Stee et al., 2023*). Ha sido descrita en varias razas de perros y esporádicamente en el gato (*Pellegrino, 2020*).

Las DCC pueden afectar selectivamente las células de Purkinje (siendo esta la presentación más habitual), las células de la granulosa (degeneración granuloprival) o involucrar ambos tipos celulares (*Sisó et al., 2006; Urkasemsin y Olby, 2014; Stee et al., 2023*).

Los síntomas clínicos característicos incluyen: dismetría produciendo una marcha hipermétrica, aumento de la base de sustentación, tendencia a perder el equilibrio y caerse hacia ambos lados, dificultad para subir escaleras, temblores de intención y ocasionalmente puede acompañarse de nistagmo (*Stee et al., 2023*).

Al examen clínico se evidencia: déficits en las pruebas de reacción postural, la respuesta a la prueba del salto ("hopping") puede estar demorada y estar acompañada una respuesta exagerada, ausencia bilateral de la respuesta de amenaza, presencia de nistagmo posicional, así como opistotono (*Stee et al., 2023; Urkasemsin y Olby, 2014*).

En la degeneración primaria de las células de Purkinje, la muerte prematura de estas células está asociada a una alteración genética subyacente, provocando la pérdida de la función inhibitoria de estas células en los núcleos cerebelosos y tronco encefálico (*Urkasemsin y Olby, 2014*). Los hallazgos neuropatológicos

consisten en una atrofia cerebelar, producto de una depleción progresiva del número total de células de Purkinje y adelgazamiento de la capa molecular. También, puede asociarse a cambios degenerativos en las neuronas como cromatolisis (Olby et al., 2004; Pellegrino, 2010; Verdes et al., 2020).

La edad de inicio y progresión de los síntomas varía según la raza afectada; pueden aparecer al nacimiento, durante la juventud, o en ocasiones, en la etapa adulta. Asimismo, el cuadro clínico puede ser progresivo o permanecer estable (Stee et al., 2023).

Las variantes genéticas sólo han podido ser identificadas para las razas: Beagle, Sabueso finlandés, Gordon Setter, Viejo pastor inglés, Braco húngaro y Terrier Escoses (Tabla 1).

Por otra parte, la degeneración granuloпрival se manifiesta como una pérdida gradual de las células granulares, con adelgazamiento de esta capa y relativa conservación de las células de Purkinje (Urkasemsin y Olby, 2014). Hasta la fecha, solo se ha podido identificar una región de interés asociada a este tipo de degeneración en perros de raza Kelpie australiano (Shearman et al., 2011; Wade, Pan, Taylor y Williamson, 2022).

No obstante, existen varios reportes esporádicos de DCC en distintas razas que posiblemente sean hereditarias, pero aún no se ha podido esclarecer su variante genética (Tabla 2) (Stee et al., 2023).

Tabla 1: Degeneración corticales cerebelosas en diversas razas caninas que poseen variante genética conocida o región de interés identificada.

Enfermedad	Raza	Inicio	Progresión	Gen	Referencia
Degeneración de las células de Purkinje	<i>Beagle</i>	3 semanas	Mínima	<i>SPTBN2</i>	Forman et al., (2012).
	<i>Sabueso Finlandes</i>	4-12 semanas	Rápida	<i>SEL1L</i>	Kyöstilä et al., (2012).
	<i>Gordon Setter</i>	6-10 meses	Lenta	<i>RAB24</i>	Agler et al., (2014).
	<i>Viejo Pastor Ingles</i>	6-40 meses	Rápida	<i>SNX14</i>	Fenn et al., (2016).
	<i>Braco Húngaro (Vizsla)</i>	2-3 meses	Lenta	<i>CFA3</i>	Urkasemsin et al., (2016).
Degeneración de las células de la granulosa	<i>Terrier Escoses</i>	2 meses – 6 años	Variable	<i>CFA9</i>	Shearman et al., (2011).
	<i>Kelpie australiano</i>	5-12 semanas		<i>CFA20</i>	Wade et al., (2022).

Fuente: Adaptado de Stee et al., (2023). CFA3: cromosoma 3, CFA9: cromosoma 9, CFA20: cromosoma 20

Tabla 2: Degeneración corticales cerebelosas en diversas razas caninas sin variante genética conocida o región de interés identificada.

Enfermedad	Raza	Inicio	Progresión	Casos	Referencia
Degeneración de las células de Purkinje	<i>Crestado Rodesiano</i>	2 semanas	Rápida	9 casos relacionados	Chieffo et al., (1994).
		9-17 semanas	Rápida	3 hermanos de camada	Perille et al., (2001).
	<i>Labrador Retriever</i>	7 semanas	Lenta	1 casos	Bildfell et al., (1995).
		9.5-6 meses	-	5 casos	Sen et al., (2017).
		4 años	Lenta	1 Caso	Bertalan et al., (2014).
	<i>Bulldog Ingles</i>	10-12 semanas	Gradual	3 casos relacionados	Gandini et al., (2005).
	<i>Podenco Portugues</i>	2-3 semanas	Rápida	2 hermanos de camada	van Tongeren et al., (2000).
	<i>Perro ganadero de Azores</i>	<16 semanas	Gradual	2 hermanos de camada	Varejao et al., (2008).
	<i>Schnauzer Miniatura</i>	3 meses	Rápida	1 caso	Berry y Blas-Machado., (2003).
	<i>Papillon</i>	5 meses	Lento	1 caso	Nibe et al., (2007).
	<i>Boxer</i>	3 años y 3 meses	Gradual	1 caso	Gumber et al., (2010).
	<i>Lagotto Romagnolo</i>	5 semanas	Rápido y luego se estabiliza	1 caso	Jokinen et al., (2007).
	<i>Samoyedo</i>	4-6 semanas	Rápido y luego se estabiliza	2 casos	de Lahunta et al., (2021).
<i>Boyero de Berna</i>	4-6 semanas	Gradual	7 casos relacionados	Carmichael et al., (1996).	
Degeneración de las células de la granulosa	<i>Collie de pelo largo</i>	4-8 semanas	Rápida	39 casos relacionados	Hartley et al., (1978).
	<i>Jack Russell Terrier</i>	2 semanas	Gradual	5 hermanos de camada	Coates et al., (1996).
	<i>Border Collie</i>	6-8 semanas	Rápida	2 hermanos de camada	Gill y Hewland., (1980).
		4 semanas	Gradual	2 hermanos de camada	Sandy et al., (2002).
	<i>Labrador Retriever</i>	13 meses	Gradual	3 hermanos de camada	Huska et al., (2013).
	<i>Sabueso bávaro de montaña</i>	3 meses	Lenta	3 casos	Flegel et al., (2007).
	<i>Coton de Tulear</i>	8 semanas	Rápida	3 casos	Tipold et al., (2000).
	<i>Kelpie australiano</i>	6 semanas	Lenta	1 caso	Huska et al., (2013).
	<i>Sabueso Italiano</i>	3 meses	Gradual	1 caso	Cantile et al., (2002).
	<i>Lagotto Romagnolo</i>	13 semanas	Rápida	1 caso	Jokinen et al., (2007).
<i>Podenco ibicenco</i>	4-6 semanas	Progresivo, puede estabilizarse	3 casos	de Lahunta et al., (2021).	

Fuente: Adaptado de Stee et. al, (2023).

2.2.2. Degeneración Espinocerebelosa

La degeneración espinocerebelosa involucra el cerebelo, bulbo raquídeo y médula espinal. Histológicamente, se observa una pérdida significativa de neuronas de Purkinje, acompañada de una disminución neuronal en los núcleos profundos del cerebelo. Además, se identifican esferoides axonales y cuerpos de poliglucosano en el cerebelo. La degeneración neuronal también se extiende a los núcleos grácil y cuneiforme, y se detecta degeneración axonal en las columnas dorsales y en las áreas laterales y ventromediales de la médula espinal (Urkasemsin y Olby, 2014).

La ataxia espinocerebelosa puede presentarse como una entidad aislada o formando parte de un síndrome neurológico (Stee et al., 2023). Ha sido reportada en múltiples razas (Tabla 3), de las cuales se destacan: el Spaniel Bretón, el Jack Russell y Fox Terrier (Stee et al., 2023).

Una variante de inicio tardío ha sido descrita en el Spaniel Bretón, donde los síntomas clínicos comienzan entre los 7-13 años de vida y es de carácter progresivo (Higgins, Le Couteur, Kornegay y Coates, 1998). Los animales desarrollan una marcha característica, donde hay una excesiva hipermetría de los miembros torácicos, por lo que se conoce como la “enfermedad del saludo” (Pellegrino, 2020). La base genética y su modo de herencia aún no han podido ser esclarecidos (Higgins et al., 1998).

En las razas del grupo Russell Terriers, esta patología puede presentarse bajo dos entidades clínicas distintas: la “ataxia espinocerebelosa con mioquimia, convulsiones o ambas” (conocida como SAMS, por su sigla en inglés) o como ataxia espinocerebelosa de inicio tardío (Urkasemsin y Olby, 2014).

En la SAMS, una mutación autosómica recesiva en el gen KCN10, que altera los canales de potasio de las células de la glía, es responsable de los signos clínicos (Gilliman et al., 2014). El cuadro comienza entre los 2-6 meses de edad, progresando en pocas semanas, para estabilizarse con periodos intermitentes de deterioro (Pellegrino, 2020). Los animales afectados desarrollan una marcha hipermetría y espástica (debido al aumento del tono extensor), lo que provoca un andar típico de “danza”, con una abducción exagerada de las extremidades pélvicas (Stee et al., 2023). El examen neurológico suele ser normal, pero puede

evidenciarse en algunos animales déficit en las pruebas de reacción postural y pérdida propioceptiva de los miembros torácicos (Gilliam et al., 2014). La ataxia cerebelosa se presenta con convulsiones en un 33% de los casos, mientras que en otros animales se manifiesta acompañada con mioquimia y neuromiotonia (Urkasemsin y Olby, 2014).

La ataxia espinocerebelosa de inicio tardío afecta principalmente al Parson Russell Terrier pero también ha sido reportada en algunos ejemplares de la raza Jack Russell Terriers. Los síntomas clínicos aparecen entre los 6-12 meses, motivo por el cual se lo denomina de “inicio tardío”. Los animales afectados presentan ataxia simétrica progresiva, hipermetría de los miembros pélvicos y alteración del equilibrio. Se ha identificado una variante no sinónima autosómica recesiva en el gen *CAPN1* como la causa de esta enfermedad (Forman, de Risio y Mellersh, 2013).

Tabla 3: Degeneración espinocerebelosa en diversas razas caninas que poseen una variante genética conocida.

Enfermedad	Raza	Inicio	Progresión	Gen	Referencia
Ataxia de inicio tardío	<i>Jack y Parson Russel Terriers</i>	6-12 meses	Gradual	<i>CAPN1</i>	Forman et al., (2013).
SAMS		2-6 meses	Gradual	<i>KCNJ10</i>	Gilliam et al., (2014).
SAMS	<i>Fox terrier de pelo liso Toy terrier americano Patterdale Terrier</i>	2-6 meses	Gradual	<i>KCNJ10</i>	Rohdin et al., (2015). Fisher y Liebel, (2022).
SAMS	<i>Dachshund</i>	8 semanas	Gradual	<i>KCNJ10</i>	Vanhaesebrouck et al., (2011).
SAMS/SDCA1		4-8 semanas	Progresivo/ Rápido	<i>KCNJ10</i>	van Poucke et al., (2017).
SAMS- like	<i>Pastor Belga Malinois</i>	3-6 meses	Lento	<i>SLC12A6</i>	Mauri et al., (2017). van Poucke et al., (2019).
SAMS	<i>Boyero de las Ardenas</i>	2-6 meses	Rápida / Progresiva	<i>KCNJ10</i>	Stee et al., (2023).
Ataxia Espinocerebelar	<i>Tejoneo de los Alpes</i>	3 semanas	Rápida	<i>SCN8A</i>	Letko et al., (2019).

Fuente: Adaptado de Stee et. al, (2023).

2.2.3 Ataxias Cerebelosa sin Neurodegeneración Severa

Dentro de este grupo se contemplan las enfermedades que se caracterizan por presentar signos clínicos de disfunción cerebelar sin evidenciarse cambios degenerativos en la histopatología. Se producen como consecuencia de una alteración de tipo funcional en el cerebelo. Hasta el momento, todas las variantes genéticas asociadas a estas enfermedades afectan genes que codifican proteínas involucradas en el transporte de cationes (Stee et al., 2023).

Fue descrita por primera vez en cachorro de raza Cotón de Tulear, por lo que también se la conoce como “ataxia neonatal”. Los síntomas clínicos se evidencian cuando los cachorros empiezan a caminar, momento en el que presentan temblores de intención, inestabilidad y dificultad para incorporarse. Estos animales logran desplazarse impulsándose en decúbito esternal; sin embargo, intermitentemente adoptan una postura de descerebelación, permaneciendo por largos periodos en decúbito lateral con movimientos de pedaleo (Coates, O’Brien, Kline, Gendron y Poma, 2002).

En la ataxia neonatal, a pesar de no presentar alteraciones histológicas, se ha comprobado que existe una disfunción sináptica en la capa molecular del cerebelo (Coates et al., 2002). Se identificó una mutación en el gen *GRM1* como causa de esta enfermedad. Este gen codifica para el receptor metabotrópico de glutamato 1, que tiene una función crucial en el correcto desarrollo neonatal de la corteza cerebolosa (Zeng et al., 2011).

Aparte de esta enfermedad, existen otras mutaciones específicas de raza en diferentes genes que se incluyen dentro de esta clasificación (tabla 4).

Tabla 4: Variantes genética conocidas asociada al desarrollo de Ataxias Cerebelosa sin Neurodegeneración Severa en caninos.

Enfermedad	Raza	Inicio	Progresión	Gen	Referencia
Ataxia cerebelosa sin degeneración severa	<i>Cotón de Tulear</i>	2 semanas	Estable	<i>GMR1</i>	Zeng et al., (2011).
	<i>Spinone italiano</i>	4 meses	Gradual	<i>ITPR1</i>	Forman et al., (2015).
	<i>Buhund Noruego</i>	<12 semanas	Lento	<i>KCNIP4</i>	Jenkins et al., (2020).

Fuente: Adaptado de Stee et. al, (2023).

2.2.4 Degeneración Multisistémica Canina

La degeneración multisistémica canina (DMC) es análoga a la atrofia multisistémica del hombre (Lin, Hermann y Schmahmann, 2014). Esta patología no solo afecta a las neuronas de la corteza cerebelosa, sino que también pueden involucrar múltiples de células en otras áreas, provocando una degeneración neuronal multifocal. Los cambios degenerativos se observan en los núcleos extrapiramidales y en otros sistemas motores incluyendo los núcleos subtalámico, globo pálido, núcleos septales, sustancia negra, techo del mesencéfalo, cuerpo geniculado medial, núcleos cerebelosos y vestibulares) acompañado de degeneración axonal secundaria. También, se observan cambios sutiles en los cuerpos neuronales o sus prolongaciones, que llevan a disfunciones en los circuitos neuronales asociados (March, 1996; Lorenz, Coates y Kent, 2012).

Originalmente, la DMC ha sido descrita en el Terriers Azules de Kerry y los perros Crestados chinos. La sintomatología comienza entre las 9 semanas y 6 meses de edad, siendo rápidamente progresivo. Los perros afectados desarrollan una marcha característica de “paso de ganso” (de Launta y Averill, 1976; Deforest, Eger y Basrur, 1978; O'Brien et al., 2005). Diversas mutaciones en el gen *SERAC1*, el cual codifica una proteína mitocondrial involucrada en el transporte de lípidos a través de la membrana, han sido asociadas con el desarrollo de esta enfermedad (O'Brien et al., 2013; Guo et al., 2013).

Posteriormente, se identificaron mutaciones en el gen *RAB3GAP1* como responsables del desarrollo de la enfermedad en perros de las razas Terrier Ruso Negro, Husky de Alaska y Rottweiler (Mhlanga-Mutangadura et al., 2016).

Tabla 5: Variantes génicas reportadas asociadas con la degeneración multisistémica canina.

Enfermedad	Raza	Inicio	Progresión	Gen	Referencia
	<i>Terrier Azul de Kerry</i>	9-16 semanas	Rápida	<i>SERAC1</i>	Guo et al., (2013).
	<i>Perro Crestado Chino</i>	3-6 meses	Rápida	<i>SERAC1</i>	
Degeneración Multisistémica Canina	<i>Terrier Ruso Negro</i>	3 meses	Rápida	<i>RAB3GAP1</i>	Mhlanga-Mutangadura et al., (2016).
	<i>Husky de Alaska</i>	4-5 meses	Rápida	<i>RAB3GAP1</i>	Mhlanga-Mutangadura et al., (2016).
	<i>Rottweiler</i>	6 semanas- 4 meses	Rápida	<i>RAB3GAP1</i>	

Fuente: Adaptado de Pellegrino et al., (2020).

2.2.5 Ataxia episódica

La ataxia episódica ha sido reportada únicamente en un cachorro de raza Bichon Frise de 4 meses de edad, que presentaba sintomatología neurológica intermitente que se agravaba con el pasar del tiempo (Hopkins y Clarke, 2010).

Clínicamente, presentaba episodios de hipermetría y espasticidad en los 4 miembros con caídas frecuentes, aumento de la base de sustentación, balanceo del tronco y de la cabeza, y ausencia de respuesta de amenaza (Hopkins y Clarke, 2010).

El tratamiento con 4-aminopiridina, un bloqueante de canales de potasio, resultó parcialmente efectivo en el control de la aparición de los signos clínicos ya que el cuadro aún podría desencadenarse en los periodos de ejercicio intenso o viajes largos en auto (Hopkins y Clarke, 2010; Urkasemsin y Olby, 2014).

A la fecha no ha podido establecerse la causa genética, pero es considerada un trastorno análogo a la ataxia episódica tipo 2 que afecta al hombre (Strupp et al., 2011).

2.2.6 Degeneración multifocal con predominio (espino) cerebelar

Stee et al., (2023) define esta nueva categoría dentro de la clasificación de las ataxias hereditarias donde integra todas las enfermedades en las que existe degeneración cerebelosa o espinocerebelosa con compromiso adicional de otras partes del SNC o de otros sistemas.

Se incorpora esta nueva clase para poder adaptarse a nuevos síndromes de ataxia hereditaria que no se ajustaban en la clasificación anterior existente, abarcando algunas distrofias neuroaxonales y enfermedades de almacenamiento lisosomal que causan una disfunción cerebelosa con predominio (espino) cerebelar. Asimismo, se reclasifican algunas patologías contempladas previamente como degeneración multisistémica canina. Es probable que a medida que se desarrollen nuevos estudios esta clasificación se vea modificada.

Las enfermedades contempladas, su presentación, edad de inicio, razas afectadas y genes responsables se resumen en la tabla 6.

Tabla 6: Variantes génicas reportadas asociadas a la degeneración multifocal con predominio (espino) cerebelar

Enfermedad	Raza	Inicio	Progresión	Gen	Referencia
SDCA2	<i>Pastor Belga Malinois</i>	4 semanas	Rápida	<i>ATP1B2</i>	Mauri et al., (2017).
Atrofia SNC y ataxia cerebelar	<i>Pastor Belga Malinois</i>	2 semanas	Rápida	<i>SELENOP</i>	Christen et al., (2021).
Ataxia hereditaria	<i>Pastor Australiano</i>	4-19 meses	Lenta	<i>PLPLA8</i>	Abitbol et al., (2022).
	<i>Cazador de alce noruego</i>	3-4 semanas	Rápida	<i>HACE1</i>	Bellamy et al., (2022).
Degeneración cerebelosa y complejo de miositis	<i>Retriever de Nueva Escocia</i>	10 semanas a 6 meses	-	<i>SLC25A12</i>	Christen et al., (2022).
Degeneración vacuolar	Lagotto Romagnolo	4 meses – 4 años	Gradual	<i>ATG4D</i>	Kyöstila et al., (2015).
Distrofia neuroaxonal	Rottweiler	1-2 años	Lenta	<i>VPS11</i>	Lucot et al., (2018).
Lipofuscinosis neuronal ceroida 4ª	<i>Pit Bull Terrier Staffordshire Terriers</i>	1.5-9 años	Lenta	<i>ARSG</i>	Abitbol et al., (2010).
Lipofuscinosis neuronal ceroida 10	<i>Bulldog Americano</i>	1-3 años	Lenta	<i>CTSD</i>	Awano et al., (2006).
Gangliosidosis GM1	<i>Perro de Aguas Portugués</i>	4-6 meses	Rápida	<i>GLB1</i>	Wang et al., (2000).

Fuente: Adaptado de Stee et. al, (2023).

2.2.6.1 Lipofuscinosis neuronal ceroida 4A en Staffordshire y Pit Bull Terriers

La lipofuscinosis neuronal ceroida (NCL) es una enfermedad neurodegenerativa hereditaria, caracterizada por la acumulación intracelular de material de almacenamiento autofluorescente producto de un déficit enzimático lisosomal (Abitbol et al., 2010; Katz et al., 2017). Se ha demostrado que en el Staffordshire y Pit Bull Terriers, la enfermedad es debida a una mutación en el gen *ARSG* que codifica para la enzima lisosomal arilsulfatasa G (Abitbol et al., 2010).

Originalmente, esta enfermedad fue reportada en la raza American Staffordshire Terrier por Hanzliek et al. (2003) como una abiotrofia cerebelar y descrita por Olby et al. (2004) como una degeneración cortical en base a los hallazgos

histopatológicos manifiestos en estos animales. Desde entonces, ha sido reclasificada en varias oportunidades (Jankelunas et al., 2023). Actualmente, es reconocida como NCL de Tipo 4A (NCL4A) a pesar de que algunos autores afirman que debe ser redefinida como una mucopolisacaridosis (Kowalewski et al., 2015). Nuevas investigaciones desarrolladas en ratones knockout para el gen codificante *ARSG* han evidenciado que dicha enzima lisosomal desempeña un rol crucial en la degradación del mucopolisacárido Heparan Sulfato (Kowalewski et al., 2012, 2014, 2015) y es altamente probable que este sea el material tóxico acumulado en las neuronas los perros afectados (Katz et al., 2017). Debido a las inconsistencias en la terminología utilizada en la literatura y que aún se continúa investigando sobre esta patología, nos referiremos a ella como abiotrofia cerebelar en base a su presentación clínica.

En estos animales, se describe una variante de inicio tardío, donde la edad de aparición de los primeros signos es entre los 4-6 años (rango de inicio entre 18 meses a 9 años) y el curso es inexorablemente progresivo (Agler et al., 2014; Urkasemsin y Olby, 2014; Pellegrino, 2020).

La enfermedad se caracteriza por ataxia (marcha descoordinada), hipermetría, aumento de la base de sustentación, caídas tras sacudir la cabeza, temblores que se agravan al momento de realizar alguna actividad como alimentarse o jugar (conocidos como temblores de intención), nistagmo espontáneo, entre otros. Generalmente, la enfermedad progresa en un periodo de 2 a 4 años, hasta que el animal es incapaz de deambular y cualquier movimiento brusco le produce la caída en decúbito. Previamente, la mayoría de los animales pierden la capacidad para coordinar la realización de actividades cotidianas, momento en el que los propietarios suelen optar por la eutanasia (Olby et al., 2004; Pellegrino, 2010; Verdes et al., 2020). Lamentablemente, hasta el momento no se ha descrito un protocolo terapéutico efectivo para la enfermedad por lo cual es de muy mal pronóstico (Pellegrino, 2010).

El diagnóstico definitivo de la AC puede ser realizado únicamente mediante el estudio histopatológico post mortem a partir de muestras de tejido cerebelar. Macroscópicamente, se observa una atrofia cerebelar severa, el ratio cerebelo:cerebro se encuentra entre 5-7% en los animales afectados cuando normalmente es de 10-12% (Sisó et al., 2004). Los hallazgos histopatológicos

consisten en una depleción progresiva del número total de células de la capa granulosa, pérdida de células de Purkinje y adelgazamiento de la capa molecular. También existen cambios degenerativos en las neuronas como cromatolisis (Olby et al., 2004; Pellegrino, 2010; Verdes et al., 2020), y es posible observar depósitos de lipopigmentos PAS (ácido peryódico de Schiff) positivos en las células de Purkinje remanentes y en neuronas talámicas (Olby et al., 2004). Asimismo, los núcleos talámicos y vestibulares presentan degeneración vacuolar y neuronal.

El diagnóstico presuntivo se basa en la detección de signos clínicos en los animales adultos de las razas en las que la enfermedad ha sido descrita. Además, este diagnóstico puede reforzarse mediante la observación por resonancia magnética de una reducción del tamaño del cerebelo y un incremento del espacio subaracnoideo (Olby et al., 2004). Sin embargo, hasta el momento, en Uruguay, no se cuenta con equipo de resonancia magnética disponible para uso veterinario. Adicionalmente, es posible realizar test genéticos en estos animales para detectar la presencia de homocigosis para la mutación causante de la enfermedad (Abitbol et al., 2010).

El gen *ARSG* afectado por la mutación responsable de enfermedad, se encuentra localizado en el cromosoma CFA9 y está formado por 12 exones y 11 intrones (Ensemble, 2024). Originalmente, la mutación efectora del fenotipo AC (*ARSG:c.296G>A*) se localizó en el exón 2 (Abitbol et al., 2010), sin embargo, la anotación completa del gen aún no estaba disponible en el año 2010. Utilizando bases de datos genómicas, puede observarse que la mutación se encuentra ahora localizada en el nucleótido 104 del exón 3 del gen *ARSG* (Ensemble, 2024).

A nivel de la proteína, la mutación produce el reemplazo del aminoácido arginina por histidina en la posición 99 (p.R99H), originando un cambio conformacional que afecta el sitio de catálisis produciendo una consecuente disminución de hasta el 75% de la actividad enzimática. Como resultado se da la acumulación de gránulos lisosomales autofluorescentes (compuesto por ceroides y lipofuscina) que son responsables del daño neuronal (Abitbol et al., 2010).

Abitbol et al. (2010) lograron constatar que los caninos afectados por AC son homocigotas para el Alelo A. Sin embargo, algunos individuos homocigotas no desarrollan sintomatología clínica, por lo que, el carácter hereditario parece ser autosómico recesivo con penetrancia incompleta (Abitbol et al., 2010). Asimismo, los caninos afectados suelen manifestar diferencias en la gravedad del cuadro clínico y la severidad de las lesiones patológicas, denotando también una expresividad variable. Dicha diversidad fenotípica observada en animales que comparten la mutación del gen, refleja la posibilidad de que existan interacciones de tipo ambientales o genéticas (Abitbol et al., 2010).

Los individuos homocigotos para el alelo mutante (AA), tienen riesgo de sufrir la enfermedad clínica y aportan un cromosoma con el alelo mutante a toda su progenie. Los animales heterocigotas (AG) se consideran portadores y no desarrollan signos clínicos de la enfermedad. Se cree que el alto número de animales portadores asintomáticos en la población de caninos Staffordshire terrier y Pit Bull terrier son responsables de la alta propagación del alelo mutante en la raza (Sisó et al., 2006).

Se ha demostrado que la mutación se originó a partir de un ancestro común en la década de los años cincuenta y en la actualidad se encuentra ampliamente diseminada a lo largo del mundo ya que existen reportes de casos en distintas partes de América y Europa (Olby et al., 2004). Dada la manifestación tardía de los signos clínicos de la AC sumado a que la fertilidad de los animales homocigotas mutantes no se ve afectada, es poco probable que la selección natural actúe sobre este gen permitiendo que la mutación se mantenga dentro de la población (Abitbol et al., 2010; Olby et al., 2004).

Broeckx et al. (2013) determinó que la prevalencia del alelo mutado en una muestra de 18 caninos Staffordshire terrier, provenientes de Bélgica, Alemania y Países Bajos, era cercana al 9% (Broeckx et al., 2013). No existe mayor información sobre la prevalencia de esta enfermedad en el resto del mundo. Debido al aumento de la popularidad de estas razas en los últimos años, es esperable que sea aún mayor.

El desarrollo de nuevas herramientas de diagnóstico precoz basados en la detección genética, permite disponibilizar a los criadores, un test rápido y

preciso, con el fin de poder escoger cuidadosamente su plantel de animales reproductores y así intentar frenar la difusión de la enfermedad. Asimismo, se consideraría un recurso valioso para el clínico veterinario ya que permitiría realizar un diagnóstico presuntivo ante-mortem más certero de la AC a partir de una simple muestra de sangre o células epiteliales bucales de los animales (Abitbol et al., 2010; Olby et al., 2004; Pellegrino, 2010).

3. HIPÓTESIS

La mutación responsable de la Abiotrofia Cebelar contenida en el gen *ARSG* está presente en la población de perros Pit Bull Terrier de Uruguay.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo general

Analizar la variabilidad genética de una secuencia del gen *ARSG* (exón 3) que contiene la mutación responsable de la AC en perros Pit Bull Terrier de Uruguay.

4.2 Objetivos Específicos:

1. Aislar el ADN genómico de los animales muestreados y cuantificar su concentración y pureza.
2. Amplificar por PCR el fragmento del gen *ARSG* que contiene la mutación responsable de la AC.
3. Secuenciar los amplicones obtenidos y evaluar la presencia o ausencia de cambios nucleotídicos (sinónimos y no sinónimos).
4. Calcular las frecuencias genotípicas, alélicas y haplotípicas para las variantes en la población estudiada.
5. Analizar *in silico* la estabilidad estructural y propensión amiloide de la proteína *ARSG*.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

Población de animales:

Se seleccionaron treinta caninos Pit Bull Terrier, no emparentados y sin distinción de sexo. Con el propósito de obtener una muestra representativa de la población nacional de la raza canina, se llevó a cabo la difusión de un folleto informativo en el Hospital de la Facultad de Veterinaria-UdelaR, el Kennel Club Uruguayo, el Uruguay Pitbull Club, clínicas veterinarias privadas y en plataformas de redes sociales. Las muestras sanguíneas fueron recolectadas siguiendo el protocolo CEUA N°1513, previa obtención del consentimiento informado por parte de los propietarios.

Toma y almacenamiento de muestras:

Se extrajeron muestras de sangre entera periférica (5 mL) de estos animales, las cuales fueron inmediatamente remitidas en tubos EDTA al laboratorio en condiciones de refrigeración. Las muestras se almacenaron en freezer a -20 °C hasta su procesamiento. El almacenamiento, procesamiento y análisis de las muestras se realizó en el Laboratorio de la Unidad Académica de Genética y Mejora Animal, Facultad de Veterinaria-Udelar.

Extracción del ADN Genómico:

La extracción de ADN genómico se realizó a partir de 200 µL de sangre utilizando el Kit comercial Genomic DNA Purification (Fermentas) según las indicaciones del fabricante. El ADN aislado fue cuantificado en concentración y pureza con espectrofotómetro de última generación NanoDrop™ 2000 (ThermoFisher). La integridad del ADN se evaluó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% utilizando la tinción GoodView™ (SBS Genetech Co., Ltda.). Las muestras fueron estandarizadas a una concentración final de 50 ng/µL de ADN.

Amplificación y secuenciación del exón 3 del gen *ARSG*

La amplificación de la secuencia a analizar se realizó mediante la técnica de PCR, utilizando los primers descritos previamente por Abitbol et al., (2010). La amplificación fue llevada a cabo utilizando termociclador Multigene II (Labnet Inc. Global) en un volumen final de reacción de 25 µL utilizando el Kit comercial Ranger mix (Meridian Bioscience) conteniendo: 50 ng de ADN genómico, 2 µl de

cada primer (10 pmol/μl), 12,5 μl de Ranger mix y agua Miliq hasta completar el volumen. Se utilizó un programa de amplificación clásico que consta de los siguientes pasos: 95°C por 10 min, seguido de 35 ciclos de 94°C por 40s (desnaturalización), 63°C por 30 s (annealing) y 72°C por 1 min (extensión), con una extensión final a 72°C por 10 min. Los amplicones obtenidos fueron verificados mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.5% utilizando GoodView™ (SBS Genetech Co., Ltda.) como tinción. Los productos de amplificación se enviaron a la empresa MacroGen (Corea) para su secuenciación en las direcciones forward y reverse.

Análisis bioinformático de las secuencias obtenidas:

Las secuencias obtenidas se analizaron utilizando el software de libre acceso BioEdit disponible en <http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>. Como consenso para los alineamientos se utilizó la secuencia del gen *ARSG* descargada de la base de datos genómica Ensembl (acceso: ENSCAFG00000011070).

La predicción del efecto de las posibles variantes detectadas sobre la proteína se realizó utilizando el programa de acceso libre Meta-SNP (<http://snps.biofold.org/meta-snp>). Meta-SNP es un software de consenso que asigna una puntuación combinada teniendo en cuenta las puntuaciones obtenidas en otros programas como PANTHER, PhD-SNP, SIFT y SNAP (Capriotti et al., 2013).

Efecto de los polimorfismos no sinónimos sobre la estructura espacial de proteína:

El análisis del efecto de los SNPs no sinónimos en la estructura de la proteína se realizó con el software Swiss PdbViewer V4.1 (<https://spdbv.vital-it.ch/>). La predicción de los enlaces de hidrógeno se realizó de acuerdo a Kim et al. (2020). Se consideraron los enlaces de hidrógeno predichos en el rango de 1.2 a 2.76 Å de un átomo donador compatible cuando los hidrógenos están presentes y 2.195 a 3.3 Å, cuando no están presentes. Usando las cargas superficiales de los aminoácidos expuestos de la proteína, el potencial electrostático se calculó utilizando la ecuación de Poisson-Boltzmann (Jo et al., 2022). El potencial electrostático, brinda información acerca de la interacción inter e intra molecular

de las proteínas. Mediante un mapa de superficie, es posible identificar regiones de la proteína con cambios electrónicos, observándose aminoácidos cargados positiva o negativamente. Los cambios aminoacídicos pueden alterar estos potenciales, desequilibrando la estructura terciaria de la proteína, al modificar las fuerzas eléctricas que la mantienen estable (Tomasi, 1981).

Evaluación de la propensión amiloide:

Para evaluar la propensión amiloide de la proteína en función de los polimorfismos genéticos detectados (SNPs, deleciones, inserciones), se empleó el software libre AMYCO (<http://bioinf.uab.es/amycov04/>). AMYCO utiliza un algoritmo para predecir la propensión a las fibrillas de amiloide a partir de las secuencias aminoacídicas de la proteína.

Análisis Genético-Poblacional:

Se calcularon las frecuencias alélicas y genotípicas por el método de conteo directo. Se determinó si la población se encuentra en equilibrio génico de Hardy-Weinberg mediante el test exacto de Fisher. Todos estos cálculos fueron realizados utilizando el programa de licencia libre Genepop 4.2 (Raymond y Rousset, 1995) disponible en: https://genepop.curtin.edu.au/genepop_op1.html.

6. RESULTADOS

Se logró amplificar el fragmento de 180pb correspondiente al exón 3 del gen ARSG en la totalidad de los animales analizados (figura 5).

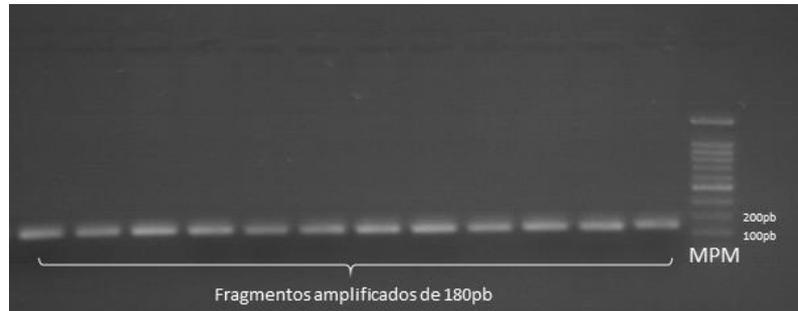


Figura 5: Electroforesis en gel de agarosa al 1,5% de los productos de PRC para la mutación responsable de la AC en el gen ARSG. MPM: marcador de peso molecular.

Al analizar la secuencia de los fragmentos amplificados, solo se detectó el SNP correspondiente a la mutación ARSG:c.296G>A previamente reportada por Abitbol et al., (2010). De los 30 animales analizados, 23 de ellos fueron homocigotas para el alelo normal (GG), 5 resultaron ser heterocigotas (GA), y los 2 restantes fueron homocigotas (AA) para el alelo mutante. En la figura 6 se muestra un electroferograma de cada uno de los genotipos.

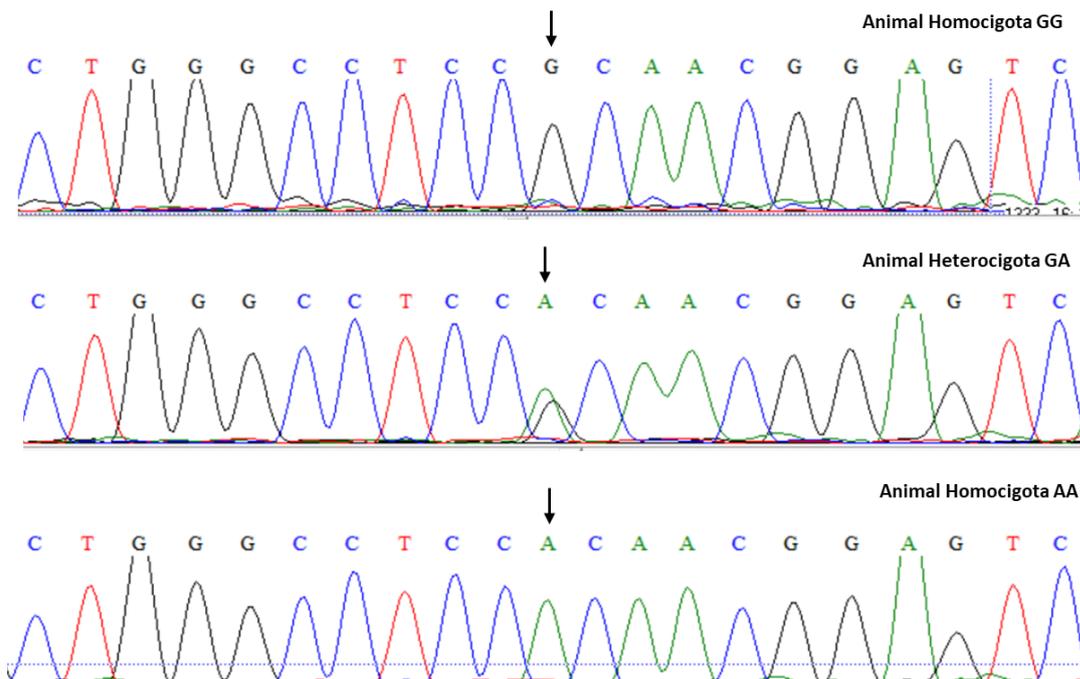


Figura 6: Electroferograma correspondientes a animales GG, GA, y AA, respectivamente. La flecha indica el sitio de la mutación.

La frecuencia del alelo mutante (A) en los animales estudiados fue de 0,15 mientras que la del alelo normal (G) fue de 0,85.

En relación a las frecuencias genotípicas, el genotipo más frecuente fue GG (0,77), seguido de AG (0,17) y por último AA (0,07). Las frecuencias genotípicas observadas y las esperadas resultaron similares (Tabla 7). La población de Pit Bull Terrier de Uruguay, se encontró en equilibrio de Hardy-Weinberg ($\chi^2=3,56$; $P=0,06$) para la mutación responsable de la AC.

Tabla 7. Frecuencia genotípica para la mutación en el Gen ARSG asociada a la Abiotrofia Cerebelar en el Pit Bull Terrier del Uruguay.

Genotipo	Observada	Esperada
GG	0,77	0,72
AG	0,17	0,26
AA	0,07	0,02

A través del programa Meta-SNP se logró predecir que el SNP ARSG:c.296G>A produce un efecto deletéreo sobre la proteína ARSG. Todos los programas utilizados por Meta-SNP arrojaron el mismo resultado de predicción (tabla 8).

Tabla 8. Análisis Meta-SNP: meta-predicador de variantes causantes de enfermedad.

Mutación	PANTHER	PhD-SNP	SIFT	SNAP	Meta-SNP	RI
R99H	0.976	0.772	0.050	0.685	0.797	6
	Disease	Disease	Disease	Disease	Disease	

Nota: valores reportados en cada predicción. PANTHER, PhD-SNP, SNAP, Meta-SNP toman valores entre 0-1 (donde >0.5 predice "disease"); SIFT toma valores mayores a 0 (donde >0.05 predice "disease"). "Disease" que implica que la variante tiene un posible impacto funcional o estructural en la proteína. RI="Reliability Index" (Índice de Fiabilidad) toma valores entre 0-10.

Al evaluar la propensión amiloide de la proteína se observó que la mutación ARSG:c.296G>A no aumenta el score AMYCO, al comparar con la proteína salvaje (figura 7)

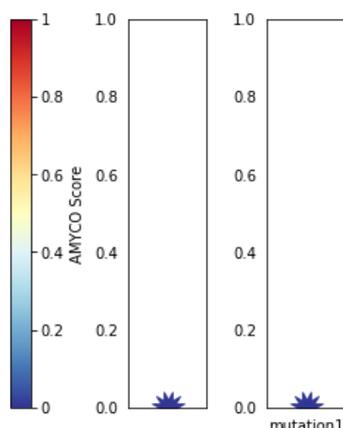


Figura 7: Representación gráfica del Score AMYCO, que muestra la propensión amiloide de la mutación ARSG.296G>A.

En relación a la predicción de los puentes de H, se observó que en la proteína ARSG salvaje el aminoácido ARG99 (R99) presenta ocho puentes de hidrógeno (dos con ASP 387, dos con ASP492, uno con ASP496, uno con ARG95, y dos con SER499). Cuando la mutación está presente, el cambio de ARG99 a HIS99 produce la pérdida de cinco puentes de hidrógeno, permaneciendo únicamente los puentes con ARG95 y SER499 (figura 8).

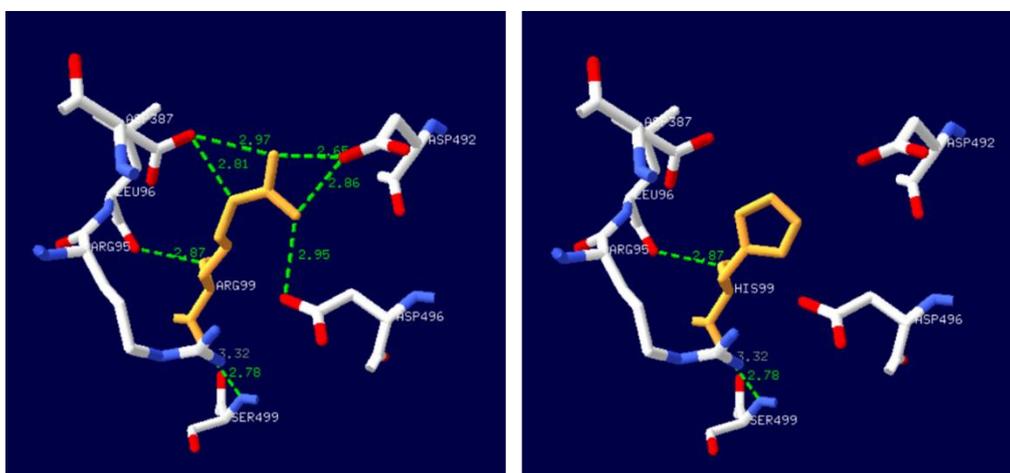


Figura 8: Puentes de hidrógeno de la proteína ARSG. La línea de puntos y los números en verde indican los enlaces de hidrógeno y la distancia (Å), respectivamente. ARG: Arginina, ASP: Ácido Aspártico, HIS: Histidina, LEU: Leucina, SER: Serina.

La predicción de los potenciales electrostáticos no mostró diferencias entre la proteína salvaje y la proteína mutante (figura 9).

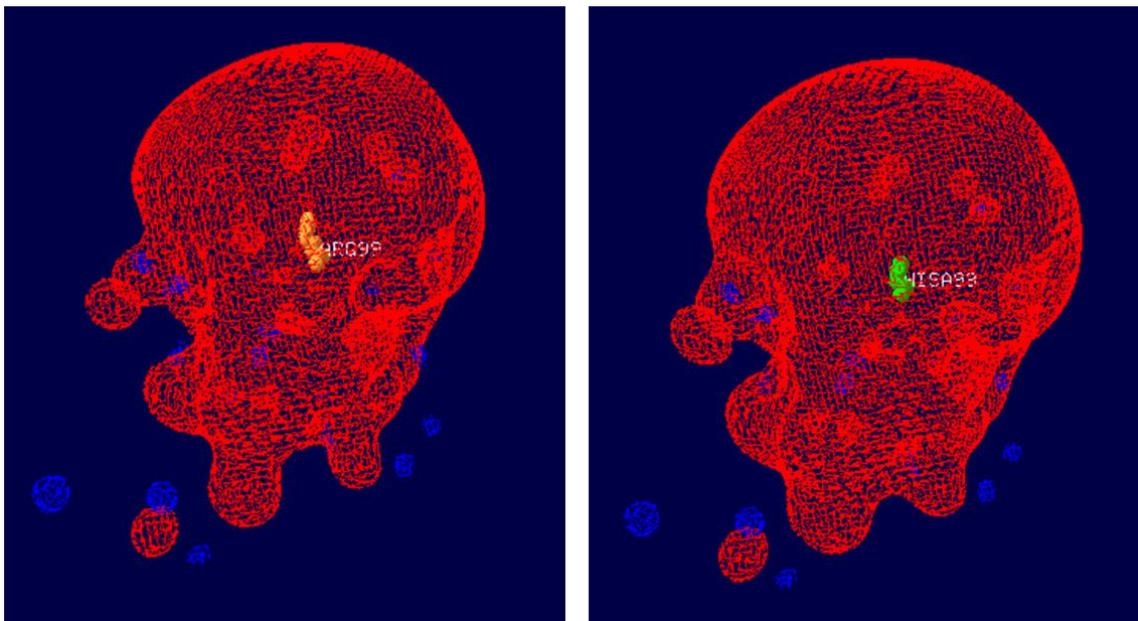


Figura 9: Efecto de la sustitución del aminoácido ARG99 por HIS99 en el potencial electrostático de la proteína ARSG. El potencial negativo se evidencia en rojo y el potencial positivo en azul.

7. DISCUSIÓN

Análisis Genético-Poblacional

Se presenta la primera evidencia molecular de la mutación ARSG:c.296G>A en caninos Pit Bull Terrier del Uruguay. El genotipo más frecuente fue el GG (0,77), seguido de GA (0,17), y finalmente AA (0,07). Estas frecuencias difieren de las encontradas originalmente por Abitbol et al. (2010) en la raza American Staffordshire Terrier de Estados Unidos (GG=0,53; GA=0,46; AA=0,01) y Francia (GG=0,43; GA=0,53; AA=0,03) dónde la cantidad de animales AA es menor.

En los animales Pit Bull Terrier de Uruguay, la frecuencia del alelo G fue de 0,85 y la del alelo A de 0,15. Esta última es muy inferior a las encontradas por Abitbol et al. (2010) en la raza American Staffordshire Terrier de Francia y Estados Unidos (A=0,24; A=0,3 respectivamente), producto de un menor número de animales portadores en Uruguay.

Posteriormente, Broeckx et al. (2013) analizaron una muestra poblacional de 18 caninos Staffordshire Terrier provenientes de Bélgica, Alemania y Países Bajos, donde las frecuencias genotípicas reportadas fueron GG=0,82; GA=0,18; AA=0,00. Cabe destacar que ninguno de los animales incluidos en esa investigación fue homocigota para el alelo mutado. La frecuencia del alelo A fue 0,09 siendo el más bajo reportado hasta el momento (Broeckx et al., 2013). Sin embargo, es importante señalar el bajo número de animales analizados, provenientes de tres países diferentes.

Donner et al. (2018) llevaron a cabo un estudio para determinar la frecuencia de 152 variantes genéticas asociadas a diferentes enfermedades hereditarias en 83.220 perros cruce provenientes en su mayoría de EEUU, UK y Australia. Este estudio determinó que la frecuencia del alelo mutado A para la AC fue de 0,397. Hasta la fecha, para nuestro conocimiento, no existen otros reportes de la distribución alélica de la mutación ARSG:c.296G>A en otras poblaciones caninas.

Por otro lado, se observó que la población de Pit Bull Terrier, objeto de estudio en esta tesis, se encuentra en equilibrio de Hardy-Weinberg ($\chi^2=3.56$; $P=0.06$), lo cual probablemente se deba a que los animales afectados mueren a una edad

avanzada, después de haber dejado descendencia. Este equilibrio sugiere que la selección natural podría ser menos efectiva contra la mutación, manteniéndola dentro de la población (Kolbe, 2010).

Debido a que los síntomas clínicos de AC se manifiestan luego de alcanzada la edad reproductiva y que la fertilidad de los animales homocigotos mutantes no se ve comprometida, es posible una mayor dispersión y prevalencia de la mutación en el futuro cercano (Abitbol et al., 2010; Olby et al., 2004). Esto refuerza la necesidad de realizar un trabajo colaborativo entre veterinarios y criadores para controlar la difusión de la enfermedad en Pit Bull Terrier de nuestro país.

El elevado porcentaje de animales heterocigotos identificado en nuestro estudio (17% de caninos portadores) indica la importancia de incluir la realización de un test genético para la mutación ARSG:c.296G>A en los programas de cría y selección de reproductores. Los animales portadores (GA) con alto valor genético podrían seguir reproduciéndose con otros que no porten la mutación (GG), asegurando que el 50% de su descendencia no sea portadora (O'Brien y Leeb, 2014).

La erradicación de los animales portadores de la enfermedad del plantel de reproductores podría considerarse la forma más rápida de disminuir la frecuencia del alelo mutado en la población. Sin embargo, esto podría generar un efecto "cuello de botella", permitiendo el surgimiento de otras características indeseables, la emergencia de otras enfermedades genéticas o incluso alejarnos del estándar racial (Marsden et al., 2015). Idealmente, debería existir un equilibrio entre la cría selectiva basada en test genético para la mejora de la salud animal y la posible pérdida de diversidad genética como resultado de esta práctica (Wade, 2011).

Efecto de la mutación ARSG:c.296G>A sobre la predicción de la estructura de ARSG

La mutación ARSG:c.296G>A produce el cambio del aminoácido ARG99 a HIS99 en la proteína ARSG. Este cambio fue predicho por el programa Meta-SNP como "Disease", lo que implica que la variante tiene un posible impacto funcional o estructural en la proteína. La predicción fue realizada con un alto

índice de fiabilidad (RI=6). Este hallazgo bioinformático guarda un sentido biológico relacionado con la etiopatogenia de la enfermedad. Se ha demostrado que la enzima ARSG desempeña un papel clave en la degradación del mucopolisacarido Heparan Sulfato (Kowalewski et al., 2012, 2014, 2015), siendo probablemente este el material tóxico acumulado, responsable del daño neuronal (Katz et al., 2017).

En la proteína ARSG salvaje, ARG99 forma ocho puentes de hidrógeno, dos con ASP387, dos con ASP492, uno con ASP496, uno con ARG95 y dos con SER499. Estos puentes de hidrógeno juegan un papel crucial en la estabilidad estructural de la proteína, manteniendo su conformación nativa y funcionalidad (Petsko y Ringe, 2004; Branden y Tooze, 1999). Al mutar ARG99 a HIS99, se pierde la capacidad de formar cinco de estos puentes de hidrógeno, conservando únicamente los puentes con ARG95 y SER499.

La disminución en el número de puentes de hidrógeno puede resultar en una menor estabilidad de la estructura terciaria de la enzima ARSG. Los puentes de hidrógeno son esenciales para mantener la integridad estructural de las proteínas, y su pérdida puede llevar a una mayor susceptibilidad a la desnaturalización y a cambios conformacionales que comprometan su función (Petsko y Ringe, 2004; Creighton, 1993).

Las pérdidas de interacciones específicas entre aminoácidos pueden alterar la disposición espacial de los residuos en el sitio activo o en otras regiones funcionales, comprometiendo la capacidad enzimática para interactuar con el sustrato, afectando su rol biológico (Petsko y Ringe, 2004; Branden y Tooze, 1999). En este sentido, Abitol et al. (2010) demostró que la mutación ARSG:c.296G>A produce un cambio conformacional que afecta el sitio de catálisis produciendo una consecuente disminución de hasta el 75% de la actividad enzimática.

Es relevante mencionar que la predicción de los potenciales electrostáticos no mostró diferencias significativas entre la proteína salvaje y la proteína mutante. Esto es congruente con las propiedades químicas de los aminoácidos involucrados (ARG99 e HIS99), ya que ambos son hidrofílicos y presentan carga

positiva. Por lo tanto, no hay cambios en la distribución de cargas electrostáticas que alteren drásticamente la función de la proteína (Branden y Tooze, 1999).

Al considerar la predicción de la propensión amiloide se observó que tanto la proteína salvaje como la mutada presentan el mismo score AMYCO. Esto es consistente con los hallazgos bioinformáticos anteriores acerca de los potenciales electrostáticos. De tal forma que la pérdida de los puentes de hidrógeno afectaría más a la funcionalidad de la proteína que a su estructura en sí. Observaciones similares fueron realizadas por Abitbol et al. (2010), quienes postulan que la mutación ARSG:c.296G>A produce una proteína estable con una severa reducción de la actividad enzimática.

8. CONCLUSIONES

Si bien el número de animales estudiados es bajo, y puede que no refleje con exactitud el comportamiento poblacional de la mutación ARSG:c.296G>A, las frecuencias reportadas pueden ser consideradas como un primer acercamiento.

La evidencia molecular de la mutación ARSG:c.296G>A, y su considerable frecuencia en la muestra analizada, pone en evidencia la necesidad de implementar planes de control para prevenir la enfermedad en la raza Pit Bull Terrier de Uruguay. En este contexto, y ante la ausencia de pruebas diagnósticas ante mortem, el genotipado de los animales adquiere especial importancia.

El cambio del aminoácido ARG99 a HIS99 no produce diferencias en la predicción de los potenciales electrostáticos, ni en la propensión amiloide, entre la proteína nativa y la mutante. Esto sugiere que la pérdida de los cinco puentes de hidrógeno puede afectar más a la funcionalidad de la enzima que a su estructura espacial.

9. BIBLIOGRAFÍA

- Abitbol, M., Thibaud, J. L., Olby, N. J., Hitte, C., Puech, J. P., Maurer, M., ... Turet, L. (2010). A canine arylsulfatase G (ARSG) mutation leading to a sulfatase deficiency is associated with neuronal ceroid lipofuscinosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(14775-14680). <https://doi.org/10.1073/pnas.0914206107>
- Abitbol, M., Jagannathan, V., Laurent, N., Godfrey, M., Sánchez-Masian, D., Ricci, A., y Lohi, H. (2022). A PNPLA8 frameshift variant in Australian shepherd dogs with hereditary ataxia. *Animal Genetics*, 3, 709-712. <https://doi.org/10.1111/age.13245>
- Acosta, A., Nieto, K., Gonzalez, A., Ovalle, L. F., Mora, J. A., y Tramontini, C. (2018). Anatomía del cerebelo en imágenes de TAC y resonancia magnética cerebral con correlación funcional. *Revista Médica Sanitas*, 21(3), 135-140. <https://doi.org/10.26852/01234250.19>
- Aige, V., y Morales, C. (2012). Anatomía del sistema nervioso. En C. Morales y P. Montoliu (Eds.), *Neurología canina y felina* (pp. 1-52). Barcelona: Multimédica.
- Agler, C., Nielsen, D. M., Urkasemsin, G., Singleton, A., Tonomura, N., Sigurdsson, S., ... Olby, N. J. (2014). Canine hereditary ataxia in Old English Sheepdog and Gordon Setters is associated with a defect in the autophagy gene encoding RAB24. *PLoS Genetics*, 10(2), e1003991. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1003991>
- Awano, T., Katz, M. L., O'Brien, D. P., Taylor, J. F., Evans, J., Khan, S., y Johnson, G. S. (2006). A mutation in the cathepsin D gene (CTSD) in American Bulldogs with neuronal ceroid lipofuscinosis. *Molecular Genetics and Metabolism*, 87(4), 341-348. <https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2005.11.005>
- Bellamy, K. K. L., Skedsmo, F. S., Hultman, J., Jaderlund, K. H., Karlsson, E. K., y Andersson, G. (2022). A 1bp deletion in HACE1 causes ataxia in Norwegian elkhound, black. *PLoS One*, 17(1), e0261845. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0261845>

- Branden, C.I., & Tooze, J. (1998). *Introduction to Protein Structure* (2^a ed.). New York: Garland Science. <https://doi.org/10.1201/9781136969898>
- Bertalan, A., Glass, E. N., Kent, M., de Lahunta, A., y Bradley, C. (2014). Late onset cerebellar abiotrophy in a Labrador retriever. *Australian Veterinary Journal*, 92(9), 339-342. <https://doi.org/10.1111/avj.12211>
- Berry, M. L., y Blas-Machado, U. (2003). Cerebellar abiotrophy in a miniature schnauzer. *The Canadian veterinary journal*, 44(8), 657-659.
- Bildfell, R. J., Mitchell, S. K., y de Lahunta, A. (1995). Cerebellar cortical degeneration in a Labrador Retriever. *Canadian Veterinary Journal*, 36(9), 570-572.
- Broeckx, B. J. G., Coopman, F., Verhoeven, G. E. C., Van Haeringen, W., van de Goor, L., Bosmans, T., ... Deforce, D. (2013). The prevalence of nine genetic disorders in a dog population from Belgium, the Netherlands and Germany. *PLoS ONE*, 8(9), 1-8. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0074811>
- Capriotti, E., Altman, R. B., y Bromberg, Y. (2013). Collective judgment predicts disease-associated single nucleotide variants. *BMC genomics*, 14 (Suppl 3), S2. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-14-S3-S2>
- Cantile, C., Salvadori, C., Modenato, M., Arispici, M., y Fatzer, R. (2002). Cerebellar granulo-prival degeneration in an Italian hound. *Journal of Veterinary Medicine Series A: Physiology, Pathology, Clinical Medicine*, 49(10), 523-525. <https://doi.org/10.1046/j.1439-0442.2002.00495.x>
- Carmichael, K. P., Miller, M., Rawlings, C. A., Fisher, A., Oliver, J. E., y Hunks, R. (1996). Clinical, hematologic and biochemical features of a syndrome in Bernese Mountain dogs characterized by hepatocerebellar degeneration. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 208, 1277-1279.
- Chieffo, C., Stalis, I. H., Van Winkle, T. J., Haskins, M. E., y Patterson, D. F. (1994). Cerebellar Purkinje cell degeneration and coat color dilution in a family of Rhodesian Ridgeback dogs. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 8 (2), 112-116. <https://doi.org/10.1111/j.1939-1676.1994.tb03207.x>

- Christen, M., Högler, S., Kleiter, M., Leschnik, M., Weber, C., Thaller, D., Jagannathan, V., y Leeb, T. (2021). Deletion of the SELENOP gene leads to CNS atrophy with cerebellar ataxia in dogs. *PLoS Genetics*, 17(8), e1009716. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1009716>
- Christen, M., Rupp, S., Van Soens, I., Bhatti, S. F. M., Matiasek, K., von Klopmann, T., ... Bannasch, D. (2022). SLC25A12 missense variant in Nova Scotia duck tolling retrievers affected by cerebellar degeneration-myositis complex (CDMC). *Genes*, 13(1223). <https://doi.org/10.3390/genes13071223>
- Coates, J. R., Carmichael, K. P., Shelton, G. D., Olby, N. J., Munana, K. R., y Lever, T. E. (1996). Preliminary characterization of a cerebellar ataxia in Jack Russell terriers. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 10, 176.
- Coates, J. R., O'Brien, D. P., Kline, K. L., Gendron, K. P., y Poma, R. (2002). Neonatal cerebellar ataxia in coton de tulear dogs. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 16(6), 680-689. [https://doi.org/10.1892/0891-6640\(2002\)016<0680:ncaicd>2.3.co;2](https://doi.org/10.1892/0891-6640(2002)016<0680:ncaicd>2.3.co;2)
- Creighton, T. E. (1993). *Proteins: Structures and molecular properties* (2^a ed.). New York: W. H. Freeman and Company.
- de Lahunta, A., y Glass, E. (2009). Cerebellum. En A. de Lahunta, E. Glass, y M. Kent (Eds.), *Veterinary Neuroanatomy and Clinical Neurology* (3^a ed., pp. 348-388). Philadelphia: Elsevier.
- de Lahunta, A., Glass, E., y Kent, M. (2021). Cerebellum. En A. de Lahunta, E. Glass, y M. Kent (Eds.), *Veterinary Neuroanatomy and Clinical Neurology* (5^a ed., pp. 374-413). Philadelphia: Elsevier.
- de Lahunta, A., y Averill, D. R. (1976). Hereditary cerebellar cortical and extrapyramidal nuclear abiotrophy in Kerry blue terriers. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 168, 1119-1124.
- Deforest, M. R., Eger, C. E., y Basrur, P. K. (1978). Hereditary cerebellar neuronal abiotrophy in a Kerry blue terrier dog. *Canadian Veterinary Journal*, 19, 198-202.

- Dewey, C. W., y da Costa, R. C. (2016). cerebellar diseases and tremor syndromes. En *Practical guide to canine and feline neurology* (3ª ed., pp. 299-327). Ames: Wiley-Blackwel.
- Donner, J., Anderson, H., Davison, S., Hughes, A. M., Bouirmane, J., Lindqvist, ... Lohi, H. (2018). Frequency and distribution of 152 genetic disease variants in over 100,000 mixed breed and purebred dogs. *PLoS genetics*, 14(4), e1007361. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1007361>
- Ensemble. (s. f.). Recuperado de <http://www.ensembl.org/index.html>
- Fenn, J., Bournsnel, M., Hitti, R. J., Jenkins, C. A., Terry, R. L., Priestnall, S. L., ... Forman, O. P. (2016). Genome sequencing reveals a splice donor site mutation in the SNX14 gene associated with a novel cerebellar cortical degeneration in the Hungarian Vizsla dog breed. *BMC Genetics*, 17, 123. <https://doi.org/10.1186/s12863-016-0433-y>
- Fisher, C., y Liebel, F. (2022). Neuromyotonia, myokimia and spinocerebellar ataxia in two Patterdale terrier littermates. *Veterinary Record*, 10, e439. <https://doi.org/10.1002/vrc2.439>
- Flegel, T., Matiasek, K., Henke, D., y Grevel, V. (2007). Cerebellar cortical degeneration with selective granule cell loss in Bavarian Mountain dogs. *Journal of Small Animal Practice*, 48(8), 462-465. <https://doi.org/10.1111/j.1748-5827.2006.00257.x>
- Fletcher, T. F., y Beitz, A. J. (2011). *Lab: Cerebellar Anatomy*. Recuperado de <https://vanat.ahc.umn.edu/neurLab6/pages/CbellSectRegions.html>
- Forman, O. P., De Risio, L., Stewart, J., Mellersh, C. S., y Beltran, E. (2012). Genome-wide mRNA sequencing of a single canine cerebellar cortical degeneration case leads to the identification of a disease associated SPTBN2 mutation. *BMC Genetics*, 13, 55. <https://doi.org/10.1186/1471-2156-13-55>
- Forman, O. P., De Risio, L., y Mellersh, C. S. (2013). Missense mutation in CAPN1 is associated with spinocerebellar ataxia in the Parson Russell Terrier dog breed. *PLoS ONE*, 8(5), e64627. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0064627>

- Forman, O. P., De Risio, L., Matiasek, K., Platt, S., Mellersh, C., y Beltran, E. (2015). Spinocerebellar ataxia in the Italian Spinone dog is associated with an intronic GAA repeat expansion in ITPR1. *Mammalian Genome*, 26(1-2), 108-117. <https://doi.org/10.1007/s00335-014-9547-6>
- Gandini, G., Botteron, C., Brini, E., Fatzer, R., Diana, A., y Jaggy, A. (2005). Cerebellar cortical degeneration in three English bulldogs: clinical and neuropathological findings. *Journal of Small Animal Practice*, 46(6), 291-294. <https://doi.org/10.1111/j.1748-5827.2005.tb00323.x>
- Gill, J. M., y Hewland, M. (1980). Cerebellar degeneration in the Border Collie. *New Zealand Veterinary Journal*, 28, 170. <https://doi.org/10.1080/00480169.1980.34737>
- Gilliam, D., O'Brien, D. P., Coates, J. R., Johnson, G. S., Johnson, G. C., Mhlanga-Mutangadura, ... Katz, M. L. (2014). A homozygous KCNJ10 mutation in Jack Russell terriers and related breeds with spinocerebellar ataxia with myokymia, seizures or both. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 28, 871-877. <https://doi.org/10.1111/jvim.12355>
- Gumber, S., Cho, D. Y., y Morgan, T. W. (2010). Late onset of cerebellar abiotrophy in a boxer dog. *Veterinary Medicine International*, 2010, 406275. <https://doi.org/10.4061/2010/406275>
- Guo, J., Zeng, R., Johnson, G. S., Mhlanga-Mutangadura, T., Morava, E., Kozicz, T., ... Schnabel, R. D. (2013, Octubre 22-26). Canine multiple system degeneration is associated with distinct SERAC1 mutations in two different dog breeds. *En Proceedings of the 63rd Annual Meeting of the American Society of Human Genetics*, Boston, USA.
- Hanzlíček, D., Kathmann, I., Bley, T., Srenk, P., Botteron, C., Gaillard, C., y Jaggy, A. (2003). Zerebelläre kortikale Abiotrophie beim American Staffordshire Terrier: Klinische und pathologische Beschreibung von drei Fällen. *Schweizer Archiv für Tierheilkunde*, 145(8), 369-375. <https://doi.org/10.1024/0036-7281.145.8.369>.
- Hartley, W. J., Barker, J. S. F., Wanner, R. A., y Farrow, B. R. H. (1978). Inherited cerebellar degeneration in the rough coated collie. *Australian Veterinary Practitioner*, 8(2), 79-85.

- Higgins, R. J., Le Couteur, R. A., Kornegay, J. N., y Coates, J. R. (1998). Late-onset progressive spinocerebellar degeneration in Brittany spaniel dogs. *Acta Neuropathologica*, 96(1), 97-101. <https://doi.org/10.1007/s004010050865>
- Hopkins, A. L., y Clarke, J. (2010). Episodic cerebellar dysfunction in a Bichon Frise: a canine case of episodic ataxia? *Journal of Small Animal Practice*, 51, 444-446. <https://doi.org/10.1111/j.1748-5827.2010.00955.x>
- Huska, J., Gaitero, L., Snyman, Foster, R. A., y Pumarola, M. (2013). Cerebellar granulo-prival degeneration in an Australian Kelpie and a Labrador retriever dog. *Canadian Veterinary Journal*, 54, 55-60.
- Jankelunas, L., Hoehne, S. N., Chen, A. V., Williams, L., y Murthy, V. D. (2023). Cerebellar ataxia in a young dog. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 261(10), 1-4. <https://doi.org/10.2460/javma.23.04.0194>
- Jenkins, C. A., Kalmar, L., Matiasek, K., Mari, L., Kyöstilä, K., Lohi, H., y Schofield, E. C. (2020). Characterisation of canine KCNIP4: A novel gene for cerebellar ataxia identified by whole-genome sequencing two affected Norwegian Buhund dogs. *PLoS Genetics*, 16. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1008527>
- Jo, W. S., Kim, Y. C., Oem, J. K., & Jeong, B. H. (2022). First report of structural characteristics and polymorphisms of the prion protein gene in raccoon dogs: The possibility of prion disease-resistance. *Frontiers in Veterinary Science*, 9, 989352. <https://doi.org/10.3389/fvets.2022.989352>
- Jokinen, T. S., Rusbridge, C., Steffen, F., Viitmaa, R., Syrjä, P., Kyöstilä, K., ... Sainio, K. (2007). Cerebellar cortical abiotrophy in Lagotto Romagnolo dogs. *Journal of Small Animal Practice*, 48(8), 470-473. <https://doi.org/10.1111/j.1748-5827.2006.00298.x>
- Katz, M. L., Rustad, E., Robinson, G. O., Whiting, R. E. H., Student, J. T., Coates, J. R., y Narfstrom, K. (2017). Canine neuronal ceroid lipofuscinoses: Promising models for preclinical testing of therapeutic interventions. *Neurobiology of Disease*, 108, 277-287. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2017.08.017>
- Klein, B. G. (2020). *Cunningham's Textbook of Veterinary Physiology* (6^a ed.). St. Louis: Elsevier.

- Kolbe, J. J. (2010). Hardy-Weinberg: Evaluating disequilibrium forces. En S. Braude y B. S. Low (Eds.), *Introduction to methods and models in ecology, evolution and conservation biology* (pp. 107-116). Princeton: Princeton University Press.
- Kowalewski, B., Lamanna, W. C., Lawrence, R., Damme, M., Stroobants, S., Padva, M., ... Dierks, T. (2012). Arylsulfatase G inactivation causes loss of heparan sulfate 3-O-sulfatase activity and mucopolysaccharidosis in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(26), 10310-10315. <https://doi.org/10.1073/pnas.1202071109>
- Kowalewski, B., Heimann, P., Ortkras, T., Lüllmann-Rauch, R., Sawada, T., Walkley, S. U., ... Damme, M. (2015). Ataxia is the major neuropathological finding in arylsulfatase G-deficient mice: similarities and dissimilarities to Sanfilippo disease (mucopolysaccharidosis type III). *Human Molecular Genetics*, 24(7), 1856–1868. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddu603>
- Kowalewski, B., Lübke, T., Kollmann, K., Braulke, T., Reinheckel, T., Dierks, T., y Damme, M. (2014). Molecular characterization of arylsulfatase G: expression, processing, glycosylation, transport, and activity. *The Journal of Biological Chemistry*, 289(40), 27992-28005. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.584144>
- Kyöstilä, K., Cizinauskas, S., Seppälä, E. H., Suhonen, E., Jeserevics, J., Sukura, A., ... Lohi, H. (2012). A SEL1L mutation links a canine progressive early-onset cerebellar ataxia to the endoplasmic reticulum-associated protein degradation (ERAD) machinery. *PLoS Genetics*, 8(8), e1002759. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1002759>
- Kyöstilä, K., Syrjä, P., Jagannathan, V., Chandrasekar, G., Jokinen, T. S., Seppälä, ... Leeb, T. (2015). A missense change in the ATG4D gene links aberrant autophagy to a neurodegenerative vacuolar storage disease. *PLoS Genetics*, 11(4), e1005169. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1005169>
- Letko, A., Dietschi, E., Nieburg, M., Jagannathan, V., Gurtner, C., Oevermann, A., ... Drögemüller, C. (2019). A missense variant in SCN8A in Alpine Dachsbracke dogs affected by spinocerebellar ataxia. *Genes*, 10(5), 362. <https://doi.org/10.3390/genes10050362>

- Lin, D. J., Hermann, K. L., y Schmahmann, J. D. (2014). Multiple system atrophy of the cerebellar type: Clinical state of the art. *Movement Disorders*, 29(Suppl 3), 294-304. <https://doi.org/10.1002/mds.25847>
- Lorenz, M. D., Coates, J. R., y Kent, M. (2012). Tetraparesis, hemiparesis and ataxia. En M. D. Lorenz, J. R. Coates, y M. Kent (Eds.), *Handbook of Veterinary Neurology* (5ª ed., pp. 162-200). St. Louis: Elsevier Saunders.
- Lucot, K. L., Dickinson, P. J., Finno, C. J., Mansour, T. A., Letko, A., Minor, K. M., ... Bannasch, D. L. (2018). A missense mutation in the vacuolar protein sorting 11 (VPS11) gene is associated with neuroaxonal dystrophy in Rottweiler dogs. *G3: Genes, Genomes, Genetics*, 8(8), 2773-2780. <https://doi.org/10.1534/g3.118.200376>
- March, P. A. (1996). Degenerative brain diseases. *Veterinary Clinics of North America. Small Animal Practice*, 26(4), 945-972.
- Marsden, C. D., Ortega-Del Vecchyo, D., O'Brien, D. P., Taylor, J. F., Ramirez, O., Vila, C., ... Lohmueller, K. E. (2016). Bottlenecks and selective sweeps during domestication have increased deleterious genetic variation in dogs. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 113(1), 152-157. <https://doi.org/10.1073/pnas.1512501113>
- Mauri, N., Kleiter, M., Dietschi, E., Leschnik, M., Högl, S., Wiedmer, M., ... Leeb, T. (2017). A SINE insertion in ATP1B2 in Belgian shepherd dogs affected by spongy degeneration with cerebellar ataxia (SDCA2). *G3: Genes, Genomes, Genetics*, 7(9), 2729-2737. <https://doi.org/10.1534/g3.117.043018>
- Mauri, N., Kleiter, M., Lechnik, M., Dietschi, E., Jagannathan, V., Drögemüller, C., ... Leeb, T. (2017). A missense variant in KCNJ10 in Belgian shepherd dogs affected by spongy degeneration with cerebellar ataxia (SDCA1). *G3: Genes, Genomes, Genetics*, 7(2), 663-669. <https://doi.org/10.1534/g3.116.038455>
- Mhlanga-Mutangadura, T., Johnson, G. S., Ashwini, A., Schnabel, R. D., Taylor, J. F., O'Brien, D. P., ... Shelton, G. D. (2016b). A homozygous RAB3GAP1.743delC mutation in Rottweilers with neuronal vacuolization and spinocerebellar degeneration. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 30(3), 813-818. <https://doi.org/10.1111/jvim.13921>

- Mhlanga-Mutangadura, T., Johnson, G. S., Schnabel, R. D., Taylor, J. F., Johnson, G. C., Katz, M. L., ... O'Brien, D. P. (2016a). A mutation in the Warburg syndrome gene, RAB3GAP1, causes a similar syndrome with polyneuropathy and neuronal vacuolation in Black Russian Terrier dogs. *Neurobiology of Disease*, 86, 75-85. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2015.11.016>
- Nibe, K., Kita, C., Morozumi, M., Uchida, K., y Tateyama, S. (2007). Clinicopathological features of canine neuroaxonal dystrophy and cerebellar cortical abiotrophy in Papillon and Papillon-related dogs. *Journal of Veterinary Medical Science*, 69(10), 1047-1052. <https://doi.org/10.1292/jvms.69.1047>
- O'Brien, D. P., Johnson, G. S., Schnabel, R. D., Khan, S., Coates, J. R., Johnson, G. C., y Taylor, J. F. (2005). Genetic mapping of canine multiple system degeneration and ectodermal dysplasia loci. *Journal of Heredity*, 96(7), 727-734. <https://doi.org/10.1093/jhered/esi086>
- O'Brien, D. P., y Leeb, T. (2014). DNA testing in neurologic diseases. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 28(4), 1186-1198. <https://doi.org/10.1111/jvim.12383>
- O'Brien, D. P., Zeng, R., Schnabel, R. D., Katz, M. L., Johnson, G. C., Taylor, J. F., y Johnson, G. S. (2013). Identification of two breed-specific mutations associated with canine multiple system degeneration using whole genome resequencing. *Proceedings of the ACVIM Forum*, Seattle.
- Olby, N., Blot, S., Thibaud, J. L., Phillips, J., O'Brien, D. P., Burr, J., ... Breen, M. (2004). Cerebellar cortical degeneration in adult American Staffordshire Terriers. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 18(2), 201-208. [https://doi.org/10.1892/0891-6640\(2004\)18<201:ccdtaa>2.0.co;2](https://doi.org/10.1892/0891-6640(2004)18<201:ccdtaa>2.0.co;2)
- Pellegrino, F. (2010). Enfermedades degenerativas cerebelosas. *Revista Argentina de Neurología Veterinaria*, 10(1) 1-57.
- Pellegrino, F. (2020). Enfermedades degenerativas primarias del sistema nervioso central. *Revista Argentina de Neurología Veterinaria*, 8(1), 1-50.

- Percy, D. H., Carmichael, L. E., Albert, D. M., King, J. M., y Jonas, A. M. (1971). Lesions in puppies surviving infection with canine herpesvirus. *Veterinary Pathology*, 8(1), 37-53. <https://doi.org/10.1177/030098587100800106>
- Perille, A. L., Baer, K., Joseph, R. J., Carrillo, J. M., y Averill, D. R. (1991). Postnatal cerebellar cortical degeneration in Labrador Retriever puppies. *The Canadian veterinary journal*, 32(10), 619-621.
- Petsko, G. A., y Ringe, D. (2004). *Protein structure and function*. London: New Science Press.
- Raymond, M., & Rousset, F. (1995). GENEPOP (version 1.2): Population genetics software for exact tests and ecumenicism. *Journal of Heredity*, 86(3), 248-249.
- Rohdin, C., Gilliam, D., O'Leary, C. A., O'Brien, D. P., Coates, J. R., Johnson, G. S., y Jäderlund, K. H. (2015). A KCNJ10 mutation previously identified in the Russell group of terriers also occurs in Smooth-Haired Fox Terriers with hereditary ataxia and in related breeds. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 57(1), 26. <https://doi.org/10.1186/s13028-015-0115-1>
- Sandy, J. R., Slocombe, R. F., Mitten, R. W., y Jedwab, D. (2002). Cerebellar abiotrophy in a family of Border Collie dogs. *Veterinary Pathology*, 39(6), 736-738. <https://doi.org/10.1354/vp.39-6-736>
- Schatzberg, S. J., Haley, N. J., Barr, S. C., Parrish, C., Steingold, S., Summers, B. A., ... Sharp, N. J. (2003). Polymerase chain reaction (PCR) amplification of parvoviral DNA from the brains of dogs and cats with cerebellar hypoplasia. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 17(4), 538-544. <https://doi.org/10.1111/j.1939-1676.2003.tb02475.x>
- Scott, E. Y., Woolard, K. D., Finno, C. J., y Murray, J. D. (2018). Cerebellar abiotrophy across domestic species. *Cerebellum (London, England)*, 17(3), 372-379. <https://doi.org/10.1007/s12311-017-0914-1>
- Sen, C., Sharma, A. K., Randhawa, C. S., y Gupta, K. (2017). Cerebellar cortical abiotrophy in young Labrador-retrievers. *Topics in Companion Animal Medicine*, 32(1), 20-23. <https://doi.org/10.1053/j.tcam.2017.06.003>

- Shearman, J. R., Cook, R. W., McCowan, C., Fletcher, J. L., Taylor, R. M., y Wilton, A. N. (2011). Mapping cerebellar atrophy in Australian Kelpies. *Animal Genetics*, 42(6), 675-678. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2052.2011.02199.x>
- Sisó, S., Hanzlíček, D., Fluehmann, G., Kathmann, I., Tomek, A., Papa, V., y Vandeveld, M. (2006). Neurodegenerative diseases in domestic animals: A comparative review. *Veterinary Journal*, 171(1), 20-38. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2004.08.015>
- Stee, K., Van Poucke, M., Lowrie, M., Van Ham, L., Peelman, L., Olby, N., y Bhatti, S. F. M. (2023). Phenotypic and genetic aspects of hereditary ataxia in dogs. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 37(4), 1306-1322. <https://doi.org/10.1111/jvim.16742>
- Strupp, M., Kalla, R., Claassen, J., Adrion, C., Mansmann, U., Klopstock, T., ... Jahn, K. (2011). A randomized trial of 4-aminopyridine in EA2 and related familial episodic ataxias. *Neurology*, 77(3), 269-275. <https://doi.org/10.1212/WNL.0b013e318225ab07>
- Sultan, F., y Glickstein, M. (2007). The cerebellum: Comparative and animal studies. *Cerebellum*, 6(3), 168-176. <https://doi.org/10.1080/14734220701332486>
- Summers, B. A., Cummings, J. F., y de Lahunta, A. (1995). *Veterinary neuropathology*. St. Louis: Mosby.
- Tipold, A., Fatzer, R., Jaggy, A., Moore, P., y Vandeveld, M. (2000). Presumed immune-mediated cerebellar granular cell degeneration in the Coton de Tuléar breed. *Journal of Neuroimmunology*, 110(1-2), 130-133. [https://doi.org/10.1016/s0165-5728\(00\)00330-1](https://doi.org/10.1016/s0165-5728(00)00330-1)
- Tomasi J., y Truhlar, D. G. (1981). *Chemical Applications of Atomic on Molecular Electrostatic Potentials*. New York: Plenum.
- Urkasemsin, G., Linder, K. E., Bell, J. S., de Lahunta, A., y Olby, N. J. (2010). Hereditary cerebellar degeneration in Scottish Terriers. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 24(3), 565-570. <https://doi.org/10.1111/j.1939-1676.2010.0499.x>

- Urkasemsin, G., Linder, K. E., Bell, J. S., de Lahunta, A., y Olby, N. J. (2011). Mapping of Purkinje neuron loss and polyglucosan body accumulation in hereditary cerebellar degeneration in Scottish Terriers. *Veterinary Pathology*, 49(5), 852-859. <https://doi.org/10.1177/0300985811412622>
- Urkasemsin, G., Nielsen, D. M., Singleton, A., Arepalli, S., Hernandez, D., Agler, C., ... Munana, K. (2017). Genetics of hereditary ataxia in Scottish Terriers. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 31(4), 1132-1139. <https://doi.org/10.1111/jvim.14738>
- Urkasemsin, G., y Olby, N. J. (2014). Canine hereditary ataxia. *Veterinary Clinics of North America. Small Animal Practice*, 44(6), 1075-1089. <https://doi.org/10.1016/j.cvsm.2014.07.005>
- van Poucke, M., Stee, K., Bhatti, S. F. M., De Bleecker, J., Vanhaesebrouck, A., Polis, I., ... Peelman, L. (2017). The novel homozygous KCNJ10 c.986T>C (p.Leu329Pro) variant is pathogenic for the SeSAME/EAST homologue in Malinois dogs. *European Journal of Human Genetics*, 25, 222-226. <https://doi.org/10.1038/ejhg.2016.157>
- van Poucke, M., Stee, K., Sonck, L., Stock, E., Bosseler, L., Van Dorpe, J., ... Broeckx, B. J. G. (2019). Truncating SLC12A6 variants cause different clinical phenotypes in humans and dogs. *European Journal of Human Genetics*, 27(10), 1561-1568. <https://doi.org/10.1038/s41431-019-0432-3>
- van Tongeren, S. E., van Vonderen, I. K., van Nes, J. J., y van den Ingh, T. S. G. A. M. (2000). Cerebellar cortical abiotrophy in two Portuguese Podenco littermates. *Veterinary Quarterly*, 22, 172-174. <https://doi.org/10.1080/01652176.2000.9695050>
- Vanhaesebrouck, A. E., Bhatti, S. F., Polis, I. E., Plessas, I. N., y Van Ham, L. M. (2011). Neuromyotonia in a dachshund with clinical and electrophysiological signs of spinocerebellar ataxia. *The Journal of Small Animal Practice*, 52(10), 547-550. <https://doi.org/10.1111/j.1748-5827.2011.01123.x>
- Varejão, A. S. P., Prada, J., y Rodrigues, P. A. (2008). Cerebellar cortical degeneration in two Azores cattle dog littermates. *Journal of Small Animal Practice*, 49, 371. <https://doi.org/10.1111/j.1748-5827.2008.00616.x>

- Verdes, J. M., Delucchi, L., Feijoó, G., Fumagalli, F., y Serpa, C. R. (2020). Estudio patológico de abiotrofia cerebelosa en American Staffordshire terrier. Primer reporte en Uruguay. *Veterinaria (Montevideo)*, 56(213), 1-6. <https://doi.org/10.29155/vet.56.213.4>
- Wade, C. M. (2011). Inbreeding and genetic diversity in dogs: results from DNA analysis. *Veterinary Journal*, 189(2), 183-188. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2011.06.017>
- Wade, C. M., Pan, A. Y. H., Taylor, R. M., y Williamson, P. (2022). Cerebellar abiotrophy in Australian working Kelpies is associated with two major risk loci. *Genes*, 13(10), 1709. <https://doi.org/10.3390/genes13101709>
- Wang, Z. H., Zeng, B., Shibuya, H., Johnson, G. S., Alroy, J., Pastores, G. M., ... Kolodny, E. H. (2000). Isolation and characterization of the normal canine β -galactosidase gene and its mutation in a dog model of GM1-gangliosidosis. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 23(6), 593-606. <https://doi.org/10.1023/a:1005630013448>
- Zeng, R., Farias, F. H. G., Johnson, G. S., Wielaender, F., Mauldin, E., Casal, M. L., ... Drögemüller, C. (2011). A truncated retrotransposon disrupts the GRM1 coding sequence in Coton de Tulear dogs with Bandera's neonatal ataxia. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 25(2), 267-272. <https://doi.org/10.1111/j.1939-1676.2010.0666.x>