



Facultad de Veterinaria
Universidad Zaragoza



Trabajo Fin de Grado en Veterinaria

Estudio de la mielopatía degenerativa canina e implicación del gen SOD1
en la enfermedad

Study of canine degenerative myelopathy and implication of SOD1 gene
in the disease

Autor

Juan García Ordóñez

Directora

Marta M^a Pérez Rontome

Facultad de Veterinaria
2021

ÍNDICE

1.	RESUMEN	1
2.	INTRODUCCIÓN	2
2.1	Definición y concepto de la mielopatía degenerativa canina	2
2.2	Etiopatogenia	3
2.3	Epidemiología.....	5
2.4	Cuadro clínico.....	6
2.5	Diagnóstico.....	7
2.6	Tratamiento.....	10
2.7	Pronóstico	11
2.8	Aproximación a la esclerosis lateral amiotrófica (ELA)	12
3.	JUSTIFICACIÓN.....	13
4.	OBJETIVOS	13
5.	METODOLOGÍA.....	14
6.	RESULTADOS	15
6.1	Mutaciones del gen SOD1 canino	15
6.2	Proteína SOD1 mutante y patogenia de la proteína mutante	17
6.3	La MDC como modelo animal de la ELA.....	23
7.	DISCUSIÓN.....	25
8.	CONCLUSIONES	26
9.	VALORACIÓN PERSONAL:.....	28
10.	BIBLIOGRAFÍA:.....	29

1. RESUMEN

La mielopatía degenerativa canina (MDC) es una enfermedad neurodegenerativa y de pronóstico grave, asociada a perros de edad adulta, que se manifiesta inicialmente como un cuadro clínico de paraparesia espástica y ataxia propioceptiva de extremidades posteriores, evolucionando finalmente a tetraparesia o tetraplejia flácidas. Actualmente, no existe un tratamiento específico curativo para la MDC y su causa es aún incierta, no obstante, el descubrimiento de una mutación en el gen que codifica la proteína superóxido dismutasa (SOD1), ha supuesto un punto de inflexión en la investigación sobre sus mecanismos patogénicos, pues ha demostrado la influencia de un componente genético en su etiología. En base a esto, se trata de una enfermedad que puede servir como modelo animal de investigación de la ELA humana asociada a mutaciones del gen SOD1.

Los resultados de esta revisión bibliográfica descriptiva muestran que las mutaciones en el gen SOD1 parecen suponer la causa primaria del desarrollo de MDC. Asimismo, los mecanismos patogénicos se apoyan en la ganancia de una función tóxica de la proteína mutante, que adquiere una mayor propensión a formar agregados y produce estímulos de estrés en el retículo endoplasmático mediante una respuesta de proteína desplegada en células del sistema nervioso central (SNC). Esta situación genera la formación de células gliales reactivas y disfuncionales que activan vías de apoptosis celular, producen sustancias proinflamatorias y migración de microglía que, en su conjunto, parecen estar relacionados con la desmielinización de los oligodendrocitos y la degeneración de las motoneuronas. No obstante, los mecanismos patogénicos de la MDC aún no están esclarecidos de forma consistente.

ABSTRACT

Canine degenerative myelopathy (CDM) is an adult-onset progressive and fatal neurodegenerative disorder initially manifesting as spastic paraparesis and proprioceptive ataxia in the hind limbs, followed by flaccid tetraparesis or tetraplegia. At the present time, there is no specific treatment for CDM and the cause remains unclear. However, the discovery of a mutation in the gene encoding the superoxide dismutase 1 (SOD1) protein has been a turning point in research into its pathogenic mechanisms, as it demonstrated the influence of a genetic component in its aetiology. Moreover, CDM can be useful as an animal model for human ALS research associated with SOD1 gene mutations.

The results in this descriptive literature review show that SOD1 mutations seem to be the primary cause of CDM. Furthermore, the pathogenic mechanisms rely on the gain of toxic function of the mutant protein, which acquires an increased propensity to form aggregates and produces stress stimuli in the endoplasmic reticulum via unfolded protein response in cells of the central nervous system (CNS). This mechanism generates reactive and dysfunctional glial cells, which activates apoptosis pathways and produces proinflammatory substances and microglial migration. These facts seem to be related to oligodendrocytes demyelination and loss of motor neurons. Nevertheless, the pathogenic mechanisms of CDM remain unclear.

2. INTRODUCCIÓN

2.1 Definición y concepto de la mielopatía degenerativa canina

La MDC es una enfermedad neurodegenerativa progresiva, de curso lento e inicio en la edad adulta, que afecta inicialmente a la médula espinal toracolumbar de la especie canina. Se caracteriza por un proceso de degeneración axonal y pérdida neuronal que se manifiesta con signos iniciales de ataxia propioceptiva y paraparesia espástica en los miembros pelvianos (síndrome de la motoneurona superior), progresando a un cuadro de tetraparesia o tetraplejia flácidas (síndrome de la motoneurona inferior) (Coates *et al.*, 2007; Awano *et al.*, 2009; Morales and Montoliu, 2012; Pellegrino, 2013; Dewey and Costa, 2015).

Esta enfermedad se ha descrito en multitud de razas de perros, aunque se presenta en mayor porcentaje en algunas razas específicas como el Pastor Alemán, Corgi galés de Pembroke, Bóxer, Crestado Rodesiano y Retriever de Chesapeake (Awano *et al.*, 2009).

Se ha demostrado la influencia de un papel genético en el origen de la enfermedad a partir del descubrimiento de una asociación con una mutación en el gen SOD1 y, aunque se han sugerido aproximaciones de los mecanismos fisiopatológicos, éstos permanecen aún sin esclarecer (Coates *et al.*, 2007; Awano *et al.*, 2009; Boeykens *et al.*, 2020).

La MDC fue descrita por primera vez en 1973, en la publicación de Averill, como un síndrome de ataxia progresiva de los miembros pelvianos que afecta principalmente al Pastor Alemán. En el análisis histopatológico se reveló degeneración masiva de axones y mielina con

astrogliosis en varios segmentos de la médula espinal, especialmente en la región torácica media (Averill, 1973). Posteriormente, se observó que también existía un compromiso de las raíces dorsales de los nervios espinales, por lo que se propuso la denominación de la enfermedad como Radiculomielopatía Degenerativa Crónica (Griffiths & Duncan, 1975), aunque, debido a la inconsistencia de la aparición de estas lesiones en estudios posteriores y a la alta predisposición racial de la enfermedad, se acabó por sugerir el nombre de Mielopatía Degenerativa del Pastor Alemán (Vandevelde *et al.*, 1978). En vista de la cantidad de términos propuestos y la multitud de razas que pueden verse afectadas, la denominación de Mielopatía Degenerativa Canina parece ser la más adecuada (Pellegrino, 2013).

2.2 Etiopatogenia

En la literatura científica se han considerado diversas etiologías posibles para la MDC, aunque las causas subyacentes de la enfermedad aún no se han esclarecido. El descubrimiento de una mutación en el gen que codifica la proteína SOD1 (Awano *et al.*, 2009) provocó un punto de inflexión en la trayectoria de la investigación de la enfermedad en estudios posteriores, centrando su atención en las alteraciones de la función de la proteína mutante SOD1 y los mecanismos fisiopatológicos tóxicos de la formación de agregados de la misma en las células del sistema nervioso central.

Previamente a la identificación de la mutación del gen SOD1, la MDC se asoció a numerosas etiologías, incluyendo, entre otras, deficiencias nutricionales y defectos autoinmunes (Pellegrino, 2013).

En un principio, la MDC se atribuyó a los efectos de la osificación dural espinal (ODE), asumiendo que las múltiples placas óseas en la duramadre pudieran provocar la compresión de raíces nerviosas. Aunque no se ha hallado la referencia original de esta especulación (Shafie, 2013; Pellegrino, 2013), se ha demostrado que la ODE es un hallazgo incidental que no tiene relación con el desarrollo de paraparesia en los perros con MDC (Averill, 1973).

La hipótesis vascular, que asociaba los cambios degenerativos a lesiones isquémicas medulares, también quedó descartada debido a la distinción en la distribución de las lesiones típica de las patologías vasculares (Averill, 1973; Pellegrino, 2013). Se ha sugerido que, por las características anatómicas de la vascularización de la región torácica, esta zona pueda ser más vulnerable a causa de una disminución de la perfusión medular proveniente de las arterias radicales, de menor diámetro en ese segmento, lo que podría suponer una predisposición la

aparición de procesos isquémicos asociados a estrés oxidativo (Caulkins, Purinton and Oliver, 1989; March *et al.*, 2009).

De acuerdo a las similitudes de la MDC con la mielopatía asociada a deficiencia de vitamina B12 de los humanos, también se valoró la posible asociación de la enfermedad canina a este déficit nutricional, sin embargo, se demostró que la administración parenteral de cobalamina (vitamina B12) no es capaz de enlentecer la evolución clínica de MDC (Polizopoulou *et al.*, 2008).

Siguiendo esta línea de potenciales causas nutricionales, se describió también la posibilidad de una asociación con la deficiencia de vitamina E, en base a la ataxia asociada a deficiencia de vitamina E (AADVE) en medicina humana, relacionada con mutaciones en el gen que codifica la proteína de transferencia del α -tocoferol (α -PTT), lo que conlleva una reducción de los niveles séricos de la misma, acumulación de radicales libres de oxígeno y degeneración neuronal (Ouahchi *et al.*, 1995; Imounan *et al.*, 2012; Pellegrino, 2013). Esta hipótesis fue descartada en vista de que la secuenciación del gen que codifica la proteína α -PTT canina no revelaba diferencias en la secuencia de nucleótidos ni aminoácidos de animales afectados por MDC (Fechner *et al.*, 2003) y que la terapia con vitamina E no modificaba el curso de la enfermedad (Polizopoulou *et al.*, 2008).

La consideración de una etiología tóxica también se tuvo en cuenta. No obstante, las patologías neurológicas secundarias a una afección metabólica o tóxica muestran típicamente un patrón de axonopatía simétrica con muerte retrógrada que no se corresponden con la degeneración asimétrica y la distribución de las lesiones medulares de la MDC (March *et al.*, 2009).

Para investigar sobre la idea de un posible origen inmunomediado, se analizó la distribución de la inmunoglobulina G (IgG) y del componente 3 del complemento (C3) en la médula espinal de 5 perros afectados por MDC, observando un incremento del depósito de ambas sustancias en zonas de mayor vascularización cercanas a las lesiones de la MDC (Barclay & Haines, 1994), lo que sugirió la posibilidad de una destrucción inmunomediada como parte de la patogénesis de la MD. Sin embargo, en otro estudio realizado en 18 perros Corgi galés de Pembroke no se mostraron estos depósitos del complemento ni infiltración de linfocitos B o T en la médula espinal (March *et al.*, 2009). Asimismo, las terapias inmunosupresoras no han logrado reducir la progresión de la enfermedad a largo plazo (Clemmons, 1992) y no existen investigaciones concluyentes acerca de la existencia de antígenos específicos que desencadenen

un mecanismo de respuesta autoinmune, por lo que las hipótesis sobre un posible origen inmunomediado no son concluyentes (Pellegrino, 2013).

La alta prevalencia de MDC en algunas razas específicas ya hizo sospechar que la enfermedad tuviera relación con un componente de base genética (Vandeveldt *et al.*, 1978; Bichsel *et al.*, 1983). En una investigación se realizó un estudio genealógico en 27 Corgi galés de Pembroke afectados por MDC, en el que se pudo demostrar que existía una estrecha relación familiar (Coates *et al.*, 2007), aunque no fue hasta el 2009 cuando se confirmó que una mutación del gen SOD1 se encontraba asociada con perros afectados por la enfermedad de forma estadísticamente significativa. De esta manera, se establecieron relaciones de semejanza entre la MDC y la ELA humana de origen genético, obteniendo así el primer modelo animal reconocido de investigación de la ELA de aparición espontánea y no inducida (Awano *et al.*, 2009). Este descubrimiento abrió las puertas a un gran número de estudios con el objetivo de esclarecer el papel de la proteína SOD1 mutante en la fisiopatología de la MDC.

2.3 Epidemiología

La MDC se asocia comúnmente a razas de perros grandes y sus cruces. La prevalencia calculada según la información aportada por hospitales que contribuyeron a The Veterinary Medical DataBases, se estimó en un 0,19% en la población general canina, mientras que las prevalencias específicas de ciertas razas como el Pastor Alemán (2,01%), Corgi galés de Cardigan (1,51%), Retriever de Chesapeake (0,83%), Crestado rodesiano (0,74%), Setter irlandés (0,68%), Bóxer (0,59%) y Corgi galés de Pembroke (0,58%) fueron significativamente mayores. Asimismo, los perros mestizos presentaron una prevalencia del 0,15 %, menor que la de la población general (Coates *et al.*, 2007).

En esta patología no hay predilección por el sexo y en la mayoría de los casos los signos aparecen a partir de los 8 años de edad (Bichsel *et al.*, 1983; Pellegrino, 2013), no obstante, existe gran variabilidad en la edad media de comunicación de los signos en relación a la raza afectada, siendo de unos 5 años en el Pastor Alemán (Averill, 1973; Griffiths & Duncan, 1975) y de 11 años en el Corgi galés de Pembroke (Coates *et al.*, 2007).

La mayoría de los perros pierden la capacidad ambulatoria entre los 6-12 meses tras la aparición de los síntomas (Morales and Montoliu, 2012). Aunque, tanto el tiempo medio transcurrido desde la aparición de los síntomas como el tiempo medio de supervivencia, pueden

verse aumentados con tratamientos de fisioterapia, llegando a cifras de 31,76 meses y 38,2 meses respectivamente (Kathmann *et al.*, 2006).

2.4 Cuadro clínico

La MDC se manifiesta como un cuadro de inicio insidioso de ataxia propioceptiva espástica y paresia de miembros posteriores, que puede ser bilateral o asimétrica. En esta etapa puede confundirse con otros problemas ortopédicos como enfermedad degenerativa articular o procesos espinales como hernias de disco o estenosis del canal medular. A medida que progresa la enfermedad, se agravan los déficits propioceptivos, observando dismetría, déficit de reacciones posturales y desequilibrios en movimientos exigentes durante la marcha, además de atrofia muscular y reflejo patelar normal o aumentado. Así, la MDC se caracteriza en un inicio por un síndrome de la motoneurona superior de localización entre los segmentos T3-L3 (Averill, 1973; Oliver, Lorenz and J.N., 2003; Kathmann *et al.*, 2006; Coates *et al.*, 2007; Morales and Montoliu, 2012).

En fases posteriores, se produce una pérdida de la función motora de extremidades inferiores, con disminución de reflejo patelar y grave atrofia muscular, traduciéndose en una evolución a un síndrome de la motoneurona inferior de los segmentos lumbosacros (Averill, 1973; Awano *et al.*, 2009; Morales and Montoliu, 2012). En algunos perros se ha comunicado la presencia de incontinencia urinaria y fecal (Kathmann *et al.*, 2006; Coates *et al.*, 2007) asociadas a lesiones en las regiones toracolumbar y lumbosacra, que comprometen las vías sensoriales de distensión vesical y colorrectal (Al-Chaer, Westlund and Willis, 1997; Pellegrino, 2013).

Simultáneamente, la disfunción motora comienza a extenderse hacia las extremidades anteriores, generándose un cuadro de tetraparesia flácida no ambulatoria (Awano *et al.*, 2009; Morales and Montoliu, 2012).

En casos más avanzados se han observado signos de afectación de los nervios craneales, incluyendo disfagia y disfonía (Morales and Montoliu, 2012). Estas fases de la enfermedad generalmente se presentan en perros de razas pequeñas o medianas, debido a una mayor facilidad en el manejo del paciente no ambulatorio y su repercusión en la postergación del momento de la eutanasia (Coates and Wininger, 2010).

En la Tabla 1 aparecen reflejados los distintos estadios de la MDC en función del grado de severidad de los signos neurológicos.

Tabla 1. Clasificación de los estadios de severidad de la mielopatía degenerativa canina en función de los signos neurológicos. Modificado de Coates et al., 2010.

Estadio	Signos neurológicos
1	Ataxia propioceptiva y paresia espástica asimétricas de extremidades posteriores. Reflejos espinales normales.
2	Paraparesia no ambulatoria o paraplejia. Reflejos espinales reducidos o ausentes. Atrofia muscular en miembros posteriores. Presencia o no de incontinencia urinaria/fecal.
3	Paraplejia flácida y paraparesia de miembros anteriores. Ausencia de reflejos espinales. Atrofia muscular severa en miembros posteriores. Incontinencia urinaria/fecal.
4	Tetraplejia flácida. Ausencia de reflejos espinales. Atrofia muscular severa generalizada. Incontinencia urinaria/fecal. Disfagia, disfonía y dificultad respiratoria.

2.5 Diagnóstico

El diagnóstico definitivo de la MDC se basa en un análisis histopatológico postmortem de la médula espinal. No obstante, se puede realizar un diagnóstico presuntivo en base a los signos clínicos y la exclusión de otras patologías que puedan presentar un cuadro clínico similar mediante resonancia magnética, mielografía o mielo-TC (Morales and Montoliu, 2012).

Un diagnóstico antemortem adecuado se basa en la reseña y el reconocimiento del inicio y patrón de progresión de la sintomatología. Los signos y hallazgos neurológicos son similares a otras enfermedades que producen compresión lenta y progresiva de la médula espinal, por lo que debe realizarse un adecuado diagnóstico diferencial del proceso. En las etapas iniciales, cuando los signos neurológicos son sutiles, se deben incluir en el diferencial algunas enfermedades ortopédicas como la displasia de cadera, la rotura de ligamentos cruzados o la enfermedad degenerativa articular, además de patologías abdominales como enfermedad prostática o hernias perineales. Cuando los signos neurológicos son más evidentes, se debe valorar presencia de hernias discales tipo Hansen II, neoplasias espinales, espondilosis vertebral,

estenosis del canal medular, formaciones quísticas sinoviales o procesos infecciosos. No obstante, la existencia de estos procesos puede ser concomitante, por lo que su confirmación no permite descartar la presencia de MDC. También se pueden tomar muestras de LCR para descartar posibles afecciones inflamatorias. En la MDC este análisis suele mostrar una celularidad normal y una concentración normal o elevada de proteínas (Vandeveldt *et al.*, 1978; Oliver, Lorenz and J.N., 2003; Coates and Wininger, 2010; Morales and Montoliu, 2012).

Las pruebas electrodiagnósticas aportan información variable en función del estadio de la enfermedad. En etapas iniciales no se encuentran alteraciones, mientras que en estadios avanzados la electromiografía muestra actividad espontánea multifocal en la musculatura apendicular distal y en la electroneurografía la velocidad de conducción nerviosa motora se encuentra disminuida, por lo que se evidencia axonopatía y desmielinización de los nervios motores (Awano *et al.*, 2009; Coates and Wininger, 2010).

La identificación de posibles biomarcadores específicos de la MDC podría servir de apoyo al diagnóstico clínico. En un estudio se detectaron concentraciones aumentadas de proteína básica de la mielina en LCR de perros afectados respecto a sanos, lo que sugiere la presencia de desmielinización activa, sin embargo, esta prueba es de utilidad para los trastornos desmielinizantes, pero no es específica para la MDC (Oji *et al.*, 2007). Posteriormente se han evaluado potenciales biomarcadores más específicos como el nivel de neurofilamentos pesados fosforilados (pNF-H) en LCR, al que se le ha estimado una sensibilidad del 80,4% y una especificidad del 95%, aunque se necesitan estudios con mayor muestra poblacional para validar el valor diagnóstico (Toedebusch *et al.*, 2017). En otro estudio reciente se investigaron 277 microARN en el plasma como potenciales biomarcadores específicos de MDC. Mediante cuantificación de los niveles plasmáticos a partir de técnicas moleculares y análisis estadísticos se identificó una correlación positiva entre la enfermedad y los niveles plasmáticos del miR-26b, con una sensibilidad del 66,7% y una especificidad del 87%. Así, se ha sugerido que el miR-26b plasmático podría ser un biomarcador novedoso para el diagnóstico antemortem de MDC, en combinación con el examen clínico (Nakata *et al.*, 2019).

En la actualidad existen pruebas genéticas comercialmente disponibles que detectan las mutaciones del gen SOD1 asociadas a MDC, lo que aumenta el índice de sospecha en el diagnóstico de la enfermedad, aunque es preciso tener en cuenta que la identificación de un individuo homocigoto para el alelo mutante no proporciona un diagnóstico preciso, puesto que no todos los perros homocigotos desarrollan la enfermedad (Awano *et al.*, 2009; Zeng, 2013).

En las descripciones histopatológicas de la médula espinal, los hallazgos patológicos son consistentes con una degeneración axonal con pérdida de mielina en todos los funículos de la sustancia blanca, aunque ésta se presenta con mayor severidad en la porción dorsal del funículo lateral, principalmente en la región torácica media y caudal. Las regiones con pérdida de axones son reemplazadas por áreas de astrogliosis, observándose en ocasiones la presencia de macrófagos junto con restos de mielina y axones (Averill, 1973; Coates *et al.*, 2007; March *et al.*, 2009). La degeneración de la sustancia blanca aparece representada por regiones de palidez, donde se ha producido una pérdida de axones y mielina. Ésta puede verse reflejada en la imagen extraída del estudio de Awano (2009; Fig. 1).

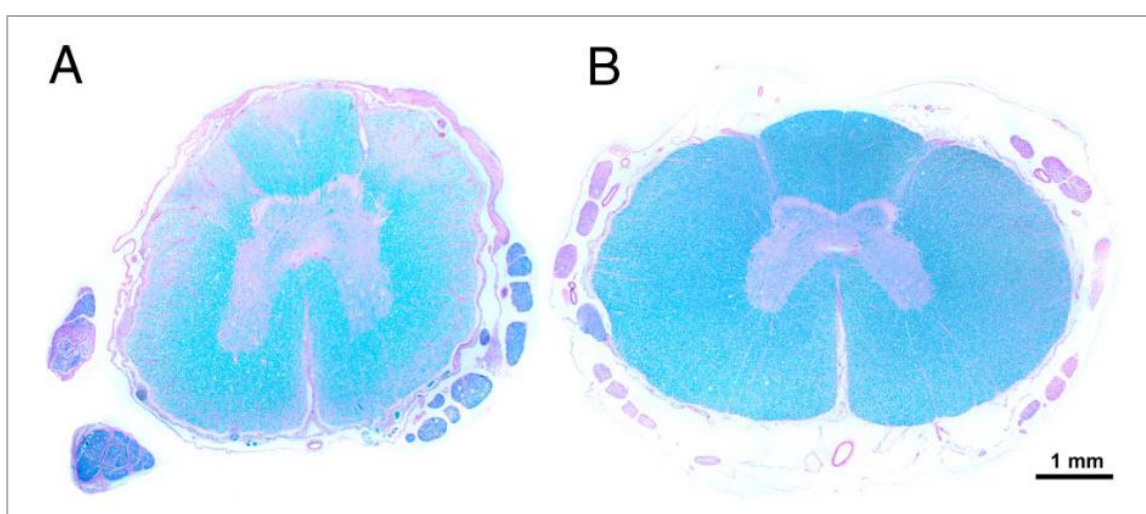


Figura 1. Histopatología (tinción de Schiff) de la médula espinal de la médula espinal torácica de (A) Corgi galés de Pembroke de 13 años afectado por MDC; (B) Labrador Retriever sano de 13 años. Awano *et al.*, 2009.

Las lesiones en la sustancia gris son moderadas, con pérdida de cuerpos neuronales predominantemente en el cuerno ventral, cromatólisis y neuronas cargadas de lipofuscina (Ogawa *et al.*, 2014).

Es estadios avanzados, se puede observar pérdida de fibras nerviosas y ovoides de mielina en algunas ramas nerviosas junto con atrofia y una marcada variabilidad en el tamaño de las células musculares. Este tipo de hallazgos son compatibles con una degeneración de tipo walleriana (Shelton *et al.*, 2012).

2.6 Tratamiento

Actualmente no existe ningún tratamiento profiláctico ni curativo específico de la MDC, todos los protocolos empleados hasta el momento han sido de carácter empírico y sin un enfoque basado en la evidencia (Coates and Wininger, 2010). Se han utilizado diversos fármacos y suplementos en base a las hipótesis postuladas a lo largo de los años, como sustancias inmunosupresoras, vitaminas, etc. Sin embargo, ninguno de ellos ha logrado mostrar un efecto beneficioso en la progresión de la enfermedad (Clemmons, 1992; Polizopoulou *et al.*, 2008).

En cambio, en lo referente a un tratamiento paliativo, la fisioterapia diaria y controlada ha demostrado aumentar significativamente los tiempos de supervivencia de los pacientes con MDC (Kathmann *et al.*, 2006; Coates and Wininger, 2010). En el estudio retrospectivo realizado por Kathmann (2006), se elaboraron distintas pautas de fisioterapia en diferentes grupos de perros para evaluar sus beneficios en el tiempo de supervivencia y evolución de la enfermedad. Además, se valoró si los resultados mostraban diferencias según la edad de aparición, la localización anatómica de las lesiones y el estado neurológico inicial al comienzo del tratamiento. La terapia se empleó en tres grupos diferenciados en base a la intensidad del tratamiento, es decir, fisioterapia intensiva, moderada o ausente. Ésta incluía ejercicios de marcha, masoterapia, movilizaciones pasivas de las articulaciones e hidroterapia (*Tabla 2*).

Tabla 2. Fisioterapia prescrita para perros con mielopatía degenerativa canina. Modificado de Kathmann *et al.*, 2006.

	Instrucciones	Duración y frecuencia
Ejercicios activos	<ul style="list-style-type: none">- Paseo controlado, con o sin férulas y cinchas.- Levantarse y sentarse varias veces, con o sin asistencia.- Correcto posicionamiento de las zarpas.- Cambios de peso en cuadrupedia.- Cambios en el terreno (hierba, asfalto, arena).- Subir escaleras, andar cuesta arriba.	- 5-10 minutos al menos 5 veces al día. Preferiblemente frecuentes y cortos, adaptados a la condición del animal.
Ejercicios pasivos	<ul style="list-style-type: none">- Movilizaciones de las articulaciones de las extremidades posteriores, comenzando distalmente.	- 3 veces al día, 10 veces en cada articulación.
Masaje	<ul style="list-style-type: none">- Masoterapia de músculos paravertebrales y de las extremidades, de distal a proximal.	- 3 veces al día.
Hidroterapia	<p>En función de las posibilidades, con o sin cincha:</p> <ul style="list-style-type: none">- Caminar sobre una cinta giratoria bajo el agua.- Nadar o caminar en agua.- Cambios de peso en cuadrupedia.	- Al menos una vez a la semana, 5-20 minutos.
Protección de las zarpas	<ul style="list-style-type: none">- Vendaje o calcetines y zapatos, si es necesario.	- Durante el paseo.

Los resultados de este estudio mostraron que el grupo de perros que recibía fisioterapia intensiva fue el que registró mayores tiempos de supervivencia, con una media de 255 días. En contraste, el tiempo de supervivencia medio de los perros que recibían fisioterapia moderada fue de 130 días, y de 55 días en los que no la recibieron. Además, estos tiempos fueron mayores en los perros con mayor grado de severidad de afección neurológica que recibieron tratamiento que en los perros con menor sintomatología que no recibieron tratamiento, reforzando la importancia del papel de la rehabilitación en el tratamiento de la MDC.

En una tesis (Marques, 2018) realizada con el objetivo de evaluar la capacidad de reorganización neural o neuroplasticidad en perros enfermos, se estudió el efecto de la neurorrehabilitación funcional controlada en 5 perros a los que se les realizó un diagnóstico de exclusión de MDC. Los resultados mostraron una mejoría en la función motora y una recuperación significativa de los reflejos espinales, el tono y la atrofia musculares.

En un estudio reciente (Miller, Torracca and De Taboada, 2020), se valoró el efecto terapéutico de la fotobiomodulación (PBMt) combinada con intervenciones de fisioterapia, en base a las evidencias en la literatura científica sobre su capacidad para modular la respuesta inflamatoria no sólo en lesiones del nervios periféricos, sino también en lesiones de la médula espinal (Hsieh *et al.*, 2012; Masoumipoor *et al.*, 2014). Se establecieron dos grupos con el mismo tratamiento de fisioterapia, pero distintos parámetros en la terapia de fotobiomodulación. Los resultados mostraron que el tiempo medio de supervivencia y el tiempo hasta la aparición de la paresia no ambulatoria era significativamente mayor en uno de los dos grupos, lo que sugiere un posible efecto beneficioso en la utilización de PBMt en combinación con una terapia de rehabilitación física intensa.

2.7 Pronóstico

El pronóstico de la MDC es desfavorable, la mayoría de los perros son sometidos a eutanasia cuando pierden la capacidad de deambular, entre los 6 y 12 meses tras el inicio de los signos (Morales and Montoliu, 2012). No obstante, con un protocolo de fisioterapia diaria y controlada, la progresión de la enfermedad puede verse enlentecida y el tiempo de supervivencia aumentado (Kathmann *et al.*, 2006; Polizopoulou *et al.*, 2008).

2.8 Aproximación a la esclerosis lateral amiotrófica (ELA)

Se denomina esclerosis lateral amiotrófica (ELA) a un grupo heterogéneo de enfermedades humanas de inicio en la edad adulta que se caracterizan por un proceso de neurodegeneración progresiva que afecta tanto a motoneuronas superiores como inferiores y, como consecuencia, produce atrofia muscular, parálisis y muerte. Se reconocen también más áreas adicionales afectadas en los lóbulos frontal y temporal, produciendo una amplia variación de presentaciones clínicas en los diferentes estadios de la enfermedad. El cuadro clínico está determinado por la ubicación y extensión de las lesiones, manifestándose principalmente con un deterioro motor que puede incluir síntomas cognitivos y/o conductuales, aunque existe una gran variabilidad en la presentación, progresión y supervivencia (Kinsley and Siddique, 1993; Boillée, Vande Velde and Cleveland, 2006; Pasinelli and Brown, 2006; Hardiman *et al.*, 2017).

Esta patología se clasifica como “ELA genética”, si presenta alguna variante patógena en un gen conocido, independientemente de los antecedentes familiares; o “ELA de causa desconocida o esporádica”, si no presenta una variante patógena en un gen conocido. Se estima que el 10% de los casos de ELA tienen antecedentes familiares, por lo que en estos casos también puede denominarse “ELA familiar”, que puede o no tener una causa genética conocida (Kinsley and Siddique, 1993).

El gen que codifica para la proteína SOD1 es el segundo gen afectado que se asocia con más frecuencia a ELA genética (15-20% de los casos) y ELA esporádica (3% de los casos), por detrás del C9orf72. Se han identificado más de 160 mutaciones diferentes del gen SOD1 humano en pacientes con ELA, también denominadas variantes, que se asocian a diferentes tiempos de evolución y supervivencia de la enfermedad. Estas mutaciones se heredan de forma autosómica dominante, aunque en algunas de ellas la penetrancia puede llegar a ser incompleta (Kinsley and Siddique, 1993; Awano *et al.*, 2009).

El manejo de la ELA se limita a un tratamiento paliativo, que requiere un equipo multidisciplinar de asesoramiento médico, psicológico y programas de rehabilitación (Kinsley and Siddique, 1993). No obstante, se plantean perspectivas más innovadoras sobre el tratamiento de la enfermedad mediante terapia génica y tratamientos con células madre que podrían marcar un cambio drástico en su enfoque terapéutico, aunque la falta de biomarcadores de diagnóstico objetivos y validados supone una barrera importante en el desarrollo de estos procedimientos (Calvo *et al.*, 2014).

3. JUSTIFICACIÓN

Las enfermedades neurodegenerativas suponen un porcentaje no desdeñable de las patologías neurológicas de la especie canina. A diferencia de los avances en las líneas de investigación de la medicina humana, el desarrollo del conocimiento en este campo de la veterinaria ha sido mucho más reducido.

A pesar de estas limitaciones, el aumento de la longevidad en los animales de compañía y la mayor concienciación de los propietarios hacia sus mascotas han facilitado la descripción de algunas enfermedades que tienen una estrecha relación con edades avanzadas, como es el caso de la MDC. El incremento en el compromiso de los propietarios también ha fomentado el desarrollo de la investigación en este tipo de enfermedades con el objetivo de dilucidar sus causas y descubrir diferentes terapias que puedan alargar la esperanza de vida de sus mascotas. Asimismo, en el caso concreto de la MDC, el descubrimiento de una relación estrecha con una mutación genética similar a la ELA familiar ha sido el foco de atención de varias líneas de investigación de medicina humana, facilitando la obtención de nuevos avances en el conocimiento de ambas enfermedades.

Por esta razón, esta revisión pretende realizar una recopilación de la información obtenida en la bibliografía científica sobre la MDC, su relación con el gen SOD1 y facilitar la comprensión de la enfermedad.

4. OBJETIVOS

- Realizar un estudio del estado actual del conocimiento sobre la mielopatía degenerativa canina a través de una revisión bibliográfica, abordando diferentes aspectos de la enfermedad como etiopatogenia, epidemiología, diagnóstico, tratamiento y pronóstico, para facilitar la comprensión y el manejo de la patología en el ámbito clínico.
- Ayudar a entender la relación entre la ELA y la MDC, enfocándose en las similitudes entre ambas enfermedades y su correlación con las mutaciones del gen que codifica la SOD1, para facilitar un posible modelo de investigación animal no murino para la ELA.

5. METODOLOGÍA

Para la elaboración de este Trabajo de Fin de Grado (TFG) se ha realizado una recopilación de la bibliografía científica más relevante con relación a la MDC y el gen SOD1 en la especie canina. Para ello, se ha recurrido principalmente a bases de datos científicas como Pubmed, Web of Science, Research Gate, ScienceDirect y Veterinary Record, además de motores de búsqueda como Alcorze y Google Académico.

En el proceso de búsqueda bibliográfica se han empleado los siguientes términos y palabras clave: “mielopatía degenerativa canina” / “canine degenerative myelopathy”, “SOD1”, “mielopatía degenerativa canina y SOD1” / “canine degenerative myelopathy and SOD1” y “ELA y SOD1”.

Asimismo, se ha utilizado la información aportada por algunos libros relacionados con la neurología de pequeños animales de la biblioteca de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Zaragoza.

A partir de los datos obtenidos durante este proceso de búsqueda, se ha elaborado una introducción sobre los conceptos generales de la MDC. Posteriormente, se ha realizado una selección de los artículos más relevantes de la última década para la obtención de los resultados, en los que se han definido las implicaciones conocidas hasta el momento del gen SOD1 en la enfermedad. Este último apartado se ha dividido en tres partes, incluyendo la descripción de las mutaciones caninas, los mecanismos patogénicos de la proteína mutante y una comparativa general entre la MDC y la ELA genética humana.

El procedimiento identificación y selección de las diferentes fuentes de bibliografía científica aparece reflejado en la siguiente figura (Fig. 2):

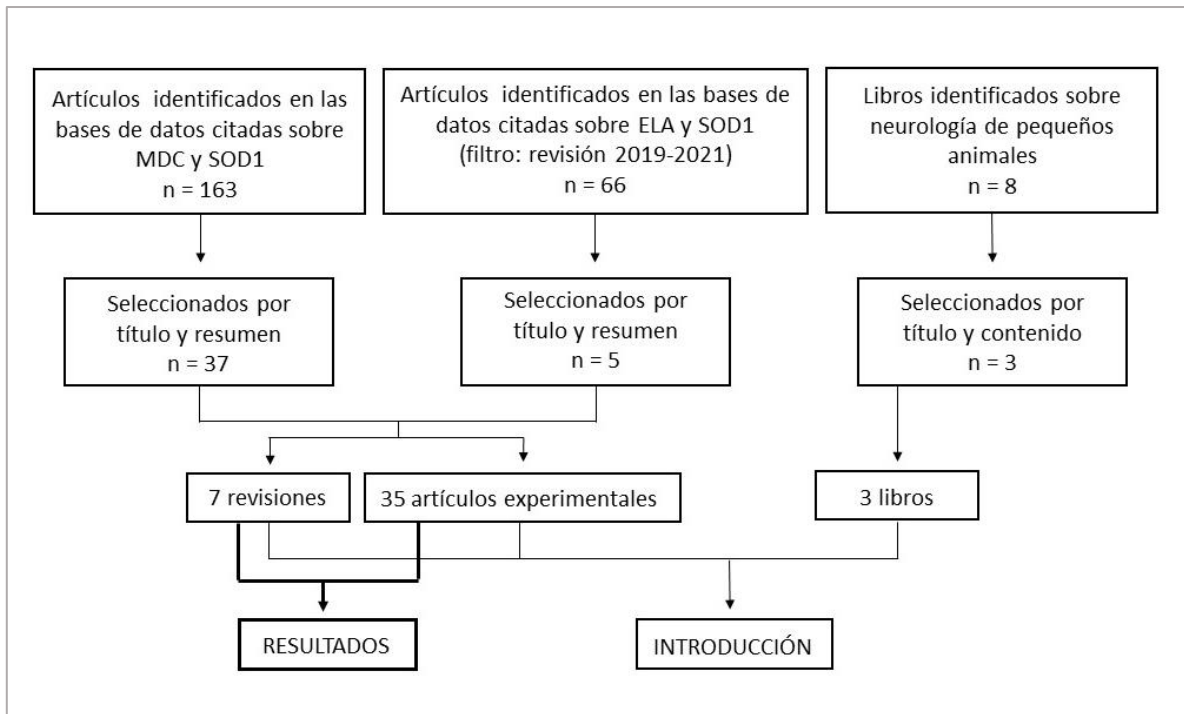


Figura 2. Identificación y selección de las diferentes fuentes de bibliografía científica.

6. RESULTADOS

Como se ha indicado en el apartado de metodología, la información extraída de la bibliografía consultada se ha dividido en tres apartados: “Mutaciones del gen SOD1 canino”, “Proteína SOD1 y patogenia de la proteína mutante” y “La MDC como modelo animal de la ELA”. En ellos se reúne la información más relevante de los artículos y revisiones utilizados.

6.1 Mutaciones del gen SOD1 canino

El trabajo de Awano y colaboradores de 2009 abrió el camino sobre una posible etiología de la enfermedad relacionada con una anomalía genética, lo que supuso la aparición numerosos estudios multidisciplinarios que se han encaminado en esta línea. En esta publicación se realizó un mapeo de asociación del genoma completo, tanto en perros con MDC como en perros sanos, y se detectaron correlaciones positivas entre perros con MDC y un haplotipo común en una región del cromosoma canino 31 (CFA 31) que contiene, entre otros, el gen SOD1. Todos los perros afectados eran homocigotos para este haplotipo común, que contiene tres genes: SOD1, TIAMI y SFRS15. De acuerdo con las similitudes entre la MDC y la ELA humana, en la cual se han estudiado numerosas mutaciones en el gen SOD1 asociadas a la enfermedad, se decidió realizar

una resecuenciación aislada del gen SOD1 canino. Esto último reveló una mutación en el nucleótido 118, en concreto, una transición de G a A en el exón 2 (SOD1:c.118G>A), que predice una mutación en sentido erróneo E40K, provocando la aparición de un codón que codifica para un aminoácido diferente. Así, la lisina sustituye al glutamato en la posición correspondiente al aminoácido 40 de la secuencia de SOD1, produciendo cambios conformacionales en la proteína. A partir de esta información, se demostró una asociación significativa entre el fenotipo de MDC y la homocigosis del alelo A. Además, se estimó un mayor porcentaje de individuos homocigotos para el alelo A en 5 razas de perros: Corgi galés de Pembroke, Bóxer, Perro crestado rodesiano y Retriever de Chesapeake.

La mayoría de los perros afectados por MDC son homocigotos para el alelo A, aunque un pequeño porcentaje de los individuos heterocigotos también desarrollan la enfermedad. No obstante, no todos los perros homocigotos para el alelo A desarrollan la enfermedad, lo que se corresponde con las características de una penetrancia incompleta y una transmisión de la enfermedad de forma autosómica recesiva, con la posible presencia de loci modificadores (Awano *et al.*, 2009; Holder *et al.*, 2014; Boeykens *et al.*, 2020).

Posteriormente, se identificó otra mutación del gen SOD1 en un Boyero de Berna, con diagnóstico histopatológico de MDC. En este caso, la resecuenciación reveló una mutación en el nucleótido 52, que predice una transición de A a T (SOD1:c.52A>T), lo que resulta en una mutación en sentido erróneo T18S en SOD1, con sustitución del aminoácido treonina por una serina en la posición correspondiente del aminoácido 18 de la proteína (Wininger *et al.*, 2011). Hasta el momento el alelo SOD1:c.52A>T parece estar únicamente presente en la raza Boyero de Berna (Zeng, 2013).

En base a la premisa de que no todos los perros homocigotos desarrollan la enfermedad, se realizó un análisis de asociación de todo el genoma en la raza Corgi galés de Pembroke comparando perros afectados por MDC y perros no afectados, siendo ambos grupos homocigotos. En este estudio se reveló un locus modificador en el cromosoma 25, un haplotipo dentro de la proteína del cuerpo nuclear SP110, involucrada en la regulación de la transcripción de genes. Este haplotipo estaba presente en el 40% de los perros afectados, en comparación con el 4% de los perros no afectados, por lo que se asoció a una mayor probabilidad de desarrollar MDC y una menor edad de aparición de los síntomas. No obstante, se necesitan más estudios para aclarar el efecto de este gen modificador (Ivansson *et al.*, 2016).

Por tanto, a pesar de que el patrón de herencia de las mutaciones de SOD1 puede considerarse simple, a nivel fenotípico la MDC es una enfermedad progresiva de aparición y

evolución variable en el tiempo, encuadrándose en un modelo hereditario autosómico recesivo de penetrancia incompleta (Boeykens *et al.*, 2020).

6.2 Proteína SOD1 mutante y patogenia de la proteína mutante

El estudio de la proteína SOD1 y la comprensión de su estructura bioquímica son esenciales para poder establecer las alteraciones conformacionales y funcionales derivadas de las mutaciones del gen que la codifica.

La proteína SOD1 es una enzima citosólica formada por un dímero activo y dos cofactores, cobre y zinc (Fig. 3), que cataliza la conversión de radicales superóxido en oxígeno y peróxido de hidrógeno (dismutación), lo que le confiere un papel clave en la defensa antioxidante de células con metabolismo aeróbico y en procesos relacionados con el estrés oxidativo. Además, se han descubierto funciones adicionales en la modulación del metabolismo, el mantenimiento del equilibrio redox y la regulación de la transcripción (Banks and Andersen, 2019). La estructura de la proteína SOD1 humana aparece reflejada en la Fig. 3 (Cohen *et al.*, 2019).

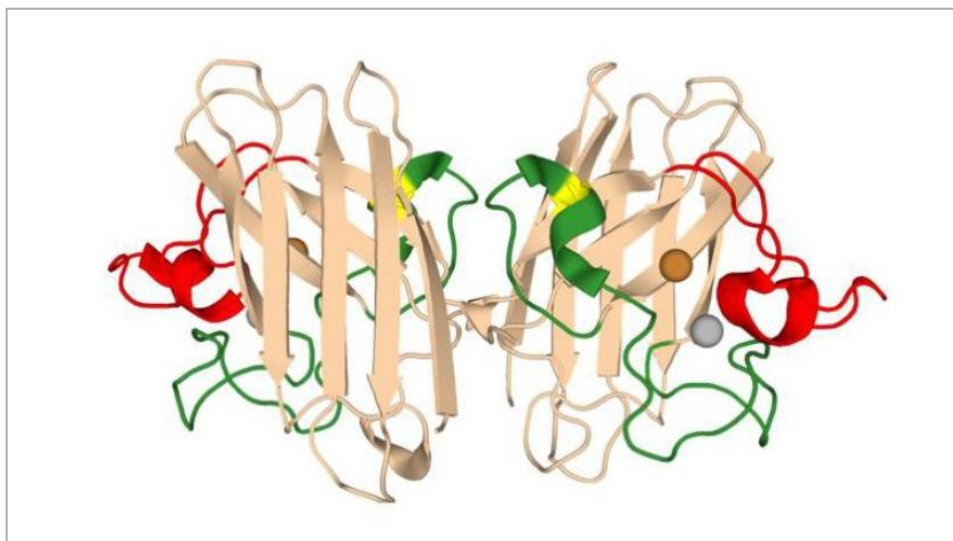


Figura 3. Estructura de la proteína SOD1. Los sitios de unión al cobre y el zinc aparecen reflejados como esferas. Los bucles de unión al zinc y los bucles con actividad electrostática aparecen en color verde y rojo, respectivamente. Adaptado de Protein Data Bank (PDB) por Cohen *et al.*, 2019.

Los cambios conformacionales producidos por mutaciones en la proteína SOD1 pueden dar lugar a una alteración de su actividad biológica y/o un aumento de su propensión a formar agregados intracelulares, lo que le confiere propiedades potencialmente tóxicas que pueden resultar en un proceso de neurodegeneración (Pellegrino, 2013). Las líneas de investigación a

partir del descubrimiento de la mutación del gen SOD1 en la MDC se han centrado en esclarecer estos dos posibles mecanismos fisiopatológicos de la proteína SOD1 mutante.

En una investigación realizada con el objetivo de caracterizar bioquímicamente a las dos proteínas SOD1 mutantes caninas conocidas hasta la fecha se obtuvieron los siguientes resultados (Fig.4; Crisp *et al.*, 2013).

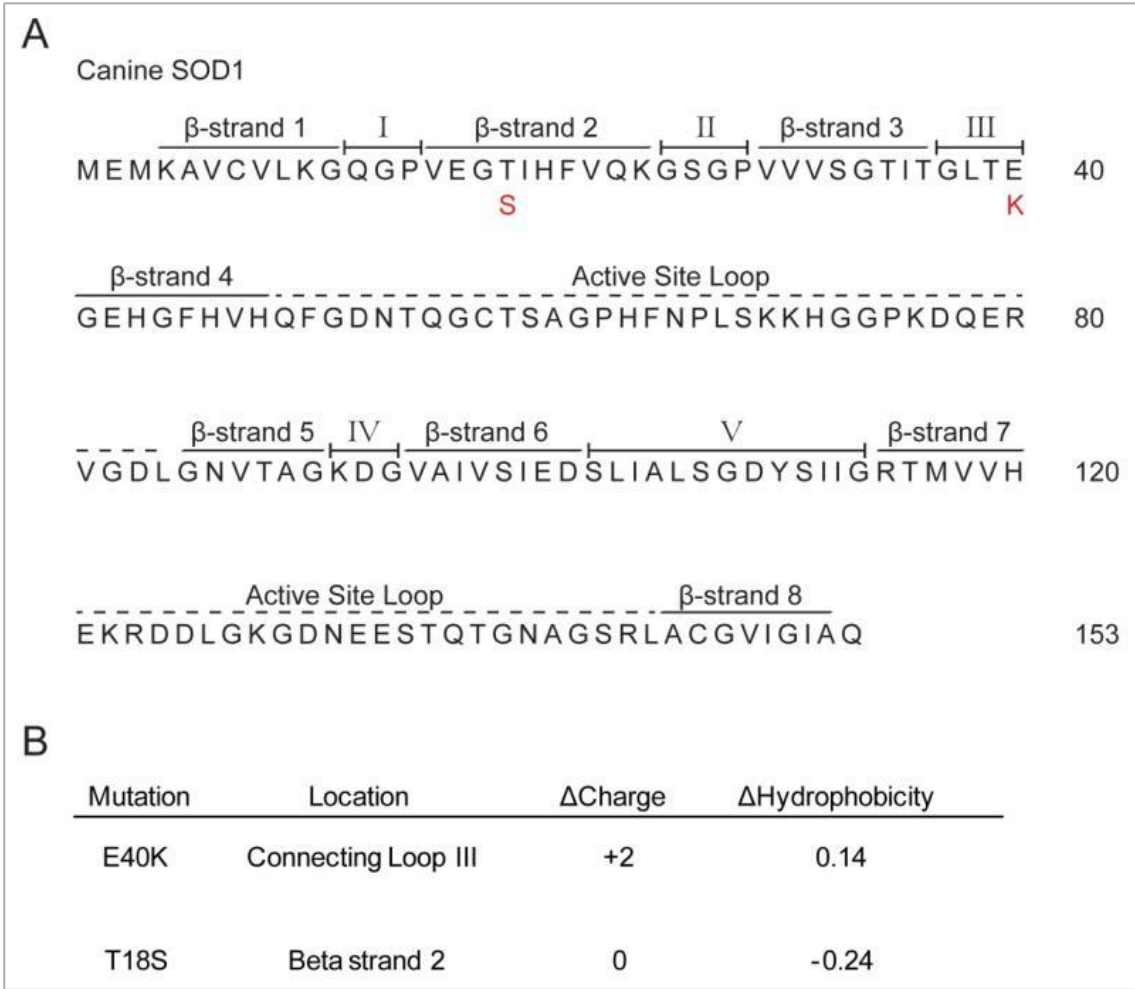


Figura 4. (A) Secuencia de aminoácidos de la proteína SOD1 canina, conteniendo 8 láminas beta intercaladas por bucles conectores y rodeando un sitio activo de unión al cobre. Las mutaciones conocidas aparecen en rojo bajo la secuencia de aminoácidos. (B) Localización, cambios en la carga y cambios en la hidrofobicidad de la proteína en ambas mutaciones caninas. Recuperado de Crisp *et al.*, 2013.

En la secuencia de aminoácidos primaria, la mutación E40K se encuentra dentro del bucle de conexión III de la proteína, lo que produce un cambio de carga +2, mientras que la mutación T18S ocurre en la segunda cadena beta y no existe un cambio de la carga de la proteína. Asimismo, ambas mutaciones dan como resultado cambios menores en la hidrofobicidad. No obstante, ninguna mutación canina interrumpe la región de unión al metal de la enzima, su sitio activo, por lo que se intuye que no hay una pérdida de actividad dismutasa.

Esto último se comprobó mediante un kit de medición de actividad de la SOD1 canina, lo que proporcionó evidencia a favor de una ganancia de función tóxica en la fisiopatología de la proteína mutante en perros homocigotos (Crisp *et al.*, 2013).

Mediante ensayos de trampa de filtro, se observó también que las proteínas mutantes SOD1 caninas son inestables y tienen mayor propensión a formar agregados en cultivo celular. Esto se justifica porque ambas exponen más fácilmente sus superficies hidrófobas. Los datos mostraron que el grado de agregación de la proteína mutante E40K era significativamente mayor que el de la proteína mutante T18S y el grado de agregación de ambas era mayor que la proteína no mutante. Además, en las muestras de médula espinal de los perros afectados se obtuvieron mayores concentraciones de agregados de SOD1 mutante insoluble en detergente, que aumentaban de acuerdo a la gravedad de la enfermedad, lo que confirma la presencia de estos agregados en el animal enfermo (Crisp *et al.*, 2013).

En otro estudio posterior se generó un anticuerpo policlonal específico de la SOD1 canina para caracterizar aún más su participación en la patogénesis de la MDC por medio de pruebas inmunohistoquímicas. Este anticuerpo (SYN3554) tenía la capacidad de revelar agregados intracitoplasmáticos en células que expresaban SOD1 mutante y reveló un patrón de agregados de la proteína en las neuronas espinales de homocigotos tanto sintomáticos como asintomáticos. En contraste, no se detectaron agregados en las neuronas espinales de perros heterocigotos ni en perros que no presentaban la mutación. Por otra parte, también se observaron acumulaciones de SOD1 en los astrocitos, que se observaron en una forma reactiva alrededor de las neuronas espinales. Estas células gliales reactivas se presentaron en un grado similar entre los individuos homocigotos y heterocigotos, lo que sustenta una estrecha relación entre los astrocitos y la patogenia de la MDC (Fig. 5; Nakamae *et al.*, 2015). Esta última afirmación se ve apoyada también por el hecho de que los astrocitos desempeñan funciones importantes en el mantenimiento de las neuronas, como la eliminación del exceso de glutamato en la hendidura sináptica y la liberación de factores neurotróficos. De hecho, se ha demostrado que existe una pérdida de transportadores de glutamato en los astrocitos de individuos afectados por MDC, contribuyendo a un aumento de excitotoxicidad que puede estar involucrada en la pérdida de neuronas (Ogawa *et al.*, 2014).

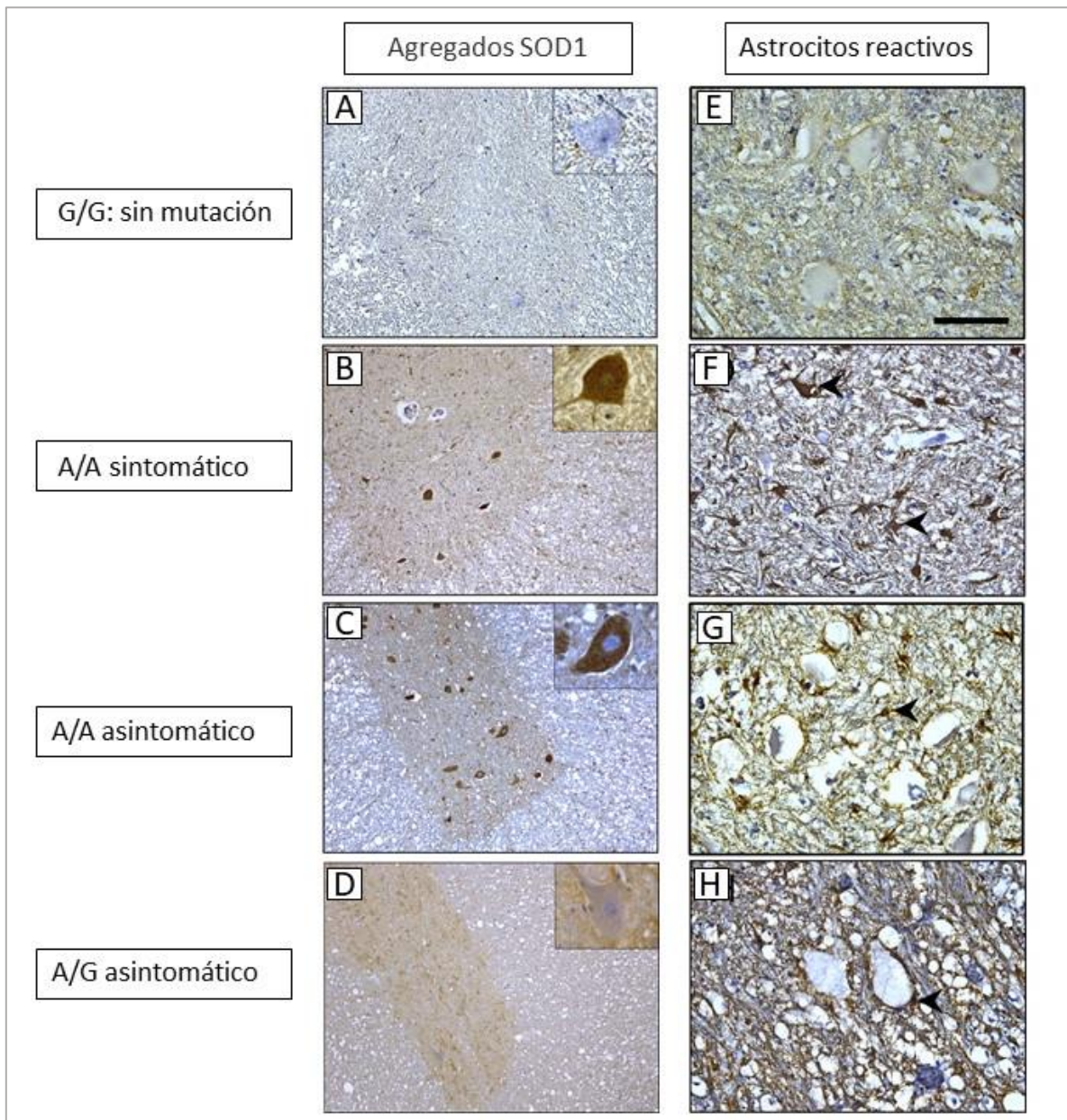


Figura 5. Inmunohistoquímica de médula espinal torácica mediante anticuerpos frente a SOD1 (A-D) y frente a GLAP, una proteína fibrilar característica en astrocitos (E-H). Modificado de Nakamae et al., 2015.

También se ha demostrado recientemente que los agregados de SOD1 son absorbidos activamente por endocitosis en las motoneuronas y que, además, éstos son transportados a células vecinas de la médula espinal con ayuda de los oligodendrocitos (Thomas *et al.*, 2017; Benkler *et al.*, 2018; Boeykens *et al.*, 2020).

La extensa línea de investigación de Ogawa y colaboradores relacionó la implicación de varios mecanismos en la patogenia de la MDC, entre ellos, el papel del estrés oxidativo, el depósito anormal de proteínas ubiquitinadas y la excitotoxicidad por disminución de transportadores de glutamato de los astrocitos (Ogawa *et al.*, 2011-2014). También sugirió que

la deficiencia en la función de la autofagia, especialmente la degradación del autofagosoma, puede estar involucrada en los mecanismos de degradación neuronal mediante muerte celular programada (Ogawa *et al.*, 2015).

Algunos estudios han relacionado el estrés del retículo endoplasmático en células del sistema nervioso central con varias enfermedades neurodegenerativas como la ELA humana. Esto es debido a la acumulación de proteínas con una estructura alterada en el lumen del retículo endoplasmático, que generan una respuesta a proteínas desplegadas o mal plegadas (Unfolded Protein Response, UPR). La UPR incrementa la producción de chaperonas moleculares involucradas en el plegamiento de las proteínas que, si se mantiene a largo plazo, activa la apoptosis celular regulada por la ASK-1 (apoptosis signal-regulating kinase 1). El primer estudio en sugerir una asociación entre el estrés del retículo endoplasmático y la patogénesis de MDC investigó la expresión de genes productores de proteínas de unión o binding proteins (BiP) del retículo endoplasmático, relacionadas con el plegamiento de proteínas y varios transcriptomas marcadores de estrés en este orgánulo. Se detectó un aumento significativo de BiP mediante técnicas inmunohistoquímicas en células gliales de la sustancia blanca, en concreto, se observaron mayores expresiones en microglía y neuronas. Además, los resultados sugieren que las vías específicas de UPR asociadas con la ASK-1 están relacionadas con la patogénesis de MDC (Yokota *et al.*, 2018).

En relación con los acúmulos de la proteína SOD1 mutante, se confirmó que los agregados se forman inicialmente en los astrocitos, generando células reactivas hipertróficas y disfuncionales (Kobatake *et al.*, 2017). En cambio, esta acumulación no se observó en la microglía durante las fases iniciales de la enfermedad. La UPR en los astrocitos anteriormente mencionados induce la expresión de citoquinas proinflamatorias, quimiocinas e interleucinas, por lo que se especula que los astrocitos hipertróficos tienen un papel proinflamatorio en las fases iniciales de la MDC, responsable de una migración y acúmulo de la microglía en las áreas afectadas (Yokota *et al.*, 2018). Esta hipótesis se vio apoyada por la detección de incrementos significativos en la transcripción de algunos microARN de los mediadores inflamatorios IL-1 β , CCL2 (ligando 2 de quimiocina CC) y VCAM-1 (molécula de adhesión vascular-1), que además se mostraron aumentados en áreas inmunopositivas de microglía y astrocitosis (Hashimoto *et al.*, 2021).

En otra investigación se evaluó el papel de las células gliales y las proteínas de transporte de monocarboxilatos (MCT) en relación con la degradación de motoneuronas en la MDC. Los MCT se encargan del transporte de monocarboxilatos de cadena corta (lactato, piruvato y

cuerpos cetónicos) a las neuronas y participan en el mantenimiento de la homeostasis celular. Se confirmó la pérdida de mielina en los oligodendrocitos por análisis cuantitativo basado en la expresión de los genes MBP (myelin basic protein), Olig1 y Olig2. Por ende, también se detectó una reducción considerable de la expresión de MCT1 y MCT2 y un incremento de la expresión de MCT4, lo que puede significar una alteración del aporte energético a las neuronas. Por lo tanto, se hipotetizó que la degeneración de los oligodendrocitos conlleva una pobre mielinización de los axones que está vinculada con alteraciones en la expresión de los MCT y la degeneración neuronal en la MDC (Golubczyk *et al.*, 2019).

Respecto a la ubiquitinación de la proteína SOD1, es decir, la adición de moléculas de ubiquitina a las proteínas como señalización para su reciclaje en los proteasomas, cabe mencionar que, mediante pruebas inmunohistoquímicas, en un estudio se observó que los agregados de la proteína mutante en la médula espinal no eran inmunopositivos a ubiquitina. Además, en este mismo estudio se realizó un cultivo de células con la mutación SOD1 canina que se sometieron a una sobrerregulación de algunos genes relacionados con la ubiquitinación de las proteínas mediante la adición de diferentes microARN. Los resultados mostraron que un aumento de miR-23a, miR-142 y miR-221 producían un incremento significativo de células con agregados de SOD1. Esto sugiere que la sobrerregulación de algunos microARN puede inhibir la ubiquitinación de la proteína SOD1 mal plegada y favorecer los agregados de la misma (Nakata *et al.*, 2021).

A modo de resumen y con el objetivo de facilitar la comprensión de la información obtenida en la bibliografía consultada, en la siguiente imagen (Fig. 6) aparecen representados de forma esquemática los diferentes mecanismos fisiopatológicos de la proteína SOD1 mutante canina sugeridos en la literatura científica, así como sus interrelaciones. La acción de dichos mecanismos y la sinergia de los mismos son compatibles con el desarrollo de procesos de desmielinización y muerte celular característicos de las motoneuronas de perros afectados por MDC.

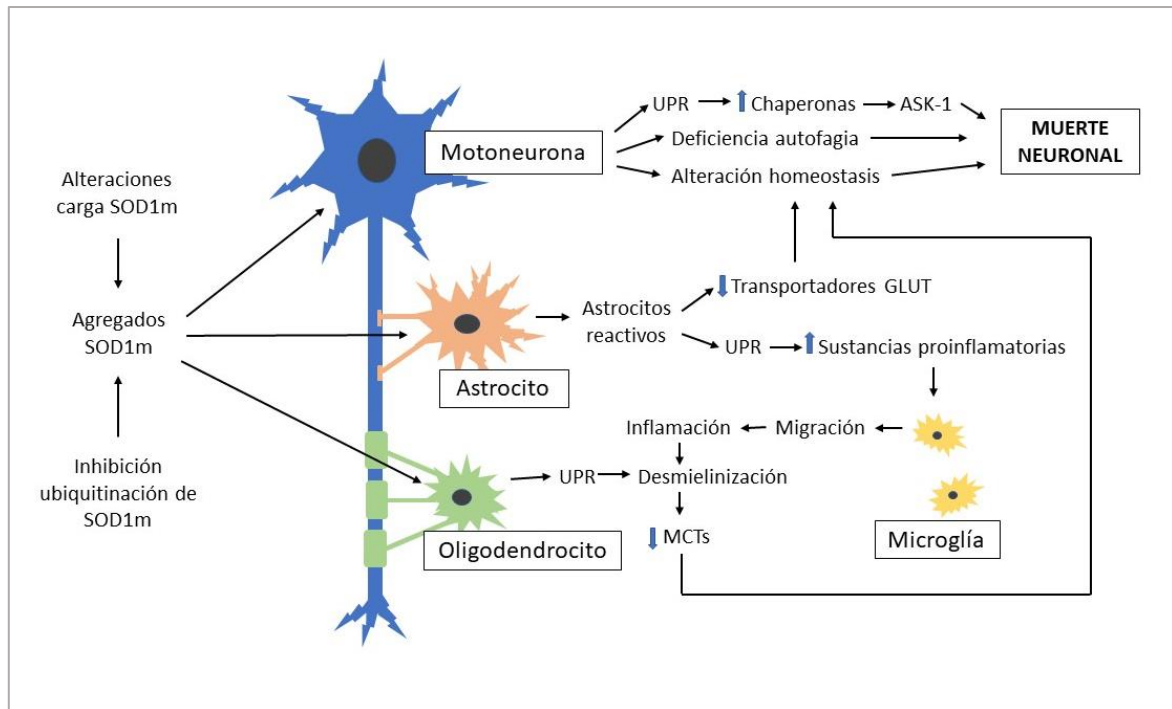


Figura 6. Resumen de los mecanismos fisiopatológicos y relaciones propuestas de la MDC y la SOD1 mutante. UPR: unfolded protein response; ASK-1: apoptosis signal-regulating kinase 1; GLUT: glutamato; MCT: monocarboxylate transporters.

Los hallazgos científicos conseguidos en los últimos años han permitido avanzar en la comprensión de la etiopatogenia de la MDC, sin embargo, la información actual es insuficiente para comprender y justificar los mecanismos fisiopatológicos de la enfermedad de forma consistente.

6.3 La MDC como modelo animal de la ELA

Previamente al descubrimiento de la mutación canina del gen SOD1 (exceptuando las mutaciones artificiales G86R y G93R creadas en el gen SOD1 del ratón y el pez cebra, respectivamente), los humanos eran los únicos individuos donde se producía una enfermedad similar a la ELA asociada a este gen (Ramesh *et al.*, 2010; Crisp *et al.*, 2013). Esta situación cambió a partir del descubrimiento de la mutación canina, que ofrecía el primer modelo animal de ELA relacionada con una mutación del gen SOD1 no inducida de forma artificial, conocida en perros como MDC, y abría muchas vías de investigación para estudios comparativos entre ambas enfermedades (Awano *et al.*, 2009).

Para poder establecer la MDC como modelo de investigación de la ELA, es necesario conocer tanto las similitudes como las diferencias entre ambas.

A nivel clínico, ambas enfermedades manifiestan una pérdida progresiva de la función motora de forma asimétrica y una marcada atrofia muscular de origen neurodegenerativo. En el caso de la MDC, esta afectación va precedida de una alteración propioceptiva de inicio en las extremidades posteriores. En contraste, la ELA no se caracteriza por la manifestación de alteraciones propioceptivas y el inicio de la sintomatología no sigue un patrón definido de miembros inferiores o superiores (Crisp *et al.*, 2013).

La SOD1 canina y la humana comparten aproximadamente un 80% de la secuencia de aminoácidos. Mientras que la mutación T18S canina ocurre en la posición de un aminoácido característico de la SOD1 del perro, la mutación E40K sí que se presenta en un residuo conservado entre la proteína humana y la canina (Crisp *et al.*, 2013).

Las dos enfermedades, asociadas a la presencia de mutaciones en el gen SOD1, comparten un modelo de herencia de enfermedad progresiva fenotípicamente complejo y de penetrancia incompleta. No obstante, mientras que la ELA humana generalmente presenta una herencia de tipo autosómica dominante, la MDC se encuadra en un patrón de herencia autosómica recesiva (Crisp *et al.*, 2013; Boeykens *et al.*, 2020).

Respecto a la patogenia, aunque los mecanismos exactos aún no se han esclarecido, varios experimentos sugieren que la neurodegeneración en ambos casos se produce por cambios conformacionales en la proteína mutante, que pueden resultar tanto en pérdida de su actividad biológica como en una ganancia de función tóxica por acumulación de agregados intracelulares de SOD1 (Awano *et al.*, 2009). Sin embargo, aunque las dos proteínas mutantes, la humana y la canina, forman agregados insolubles en detergente en la médula espinal, en el caso de la MDC, las mutaciones no suponen una pérdida de función enzimática, como sí ocurre en algunos casos de ELA familiar (Crisp *et al.*, 2013).

A nivel histopatológico, se observa una mayor degeneración de los cuerpos neuronales en el caso de la ELA (Crisp *et al.*, 2013), aunque también es preciso tener en cuenta que las muestras obtenidas de perros con MDC se obtienen generalmente de perros sometidos a eutanasia en estadios de la enfermedad que se consideran más tempranos.

La MDC no es un modelo animal de investigación idéntico a la ELA, no obstante, a pesar de sus diferencias, ofrece un sistema no artificial que difiere de otros modelos transgénicos creados hasta la fecha, el cual puede suponer avances y abrir el camino a investigaciones que puedan suponer un avance en el conocimiento de esta enfermedad neurodegenerativa humana.

7. DISCUSIÓN

La MDC ha supuesto un reto en la investigación de las enfermedades neurodegenerativas, tanto caninas como humanas. Desde la primera descripción de la enfermedad, realizada por Averill (1973), hasta el descubrimiento de una mutación del gen SOD1 asociada a la aparición de la patología (Awano *et al.*, 2009). Este último descubrimiento supuso un punto de inflexión en el enfoque de desarrollo de las líneas de investigación, a partir del cual se han llevado a cabo multitud de estudios que han supuesto grandes avances en el estado del conocimiento de la enfermedad. Este incremento en el número de investigaciones en la última década se ha debido principalmente a las similitudes entre la MDC y la ELA familiar, cuya relación ha supuesto un nuevo modelo de estudio animal para el avance en el conocimiento de la enfermedad humana, hasta ahora basado en la descripción del proceso en la propia especie humana y en mutaciones artificiales inducidas en el ratón y el pez cebra (Ramesh *et al.*, 2010; Crisp *et al.*, 2013).

Se han propuesto gran variedad de posibles etiologías que justifiquen el desarrollo la MDC, no obstante, tras la sospecha de la influencia de un componente genético (Coates *et al.*, 2007) y su posterior confirmación tras el descubrimiento de las mutaciones del gen SOD1 (Awano *et al.*, 2009; Wininger *et al.*, 2011), las investigaciones se han orientado a explicar los mecanismos patogénicos de las proteínas mutantes SOD1.

Los resultados de estas investigaciones confirman que existe una formación de agregados de la proteína mutante en el interior de las células de la médula espinal, aunque se desconoce si estas acumulaciones son el inicio en la progresión de los cambios patológicos o representan el paso final en las neuronas degeneradas (Crisp *et al.*, 2013; Nakamae *et al.*, 2015). Asimismo, se ha demostrado que no existe una pérdida de función de la actividad de la proteína SOD1, lo que proporciona evidencia a favor de una ganancia de función tóxica en la fisiopatología de la proteína mutante (Crisp *et al.*, 2013). Existe una estrecha relación entre los astrocitos y la patogenia de la enfermedad, esto se fundamenta en que los agregados se acumulan inicialmente en estas células, encargadas de la homeostasis y el mantenimiento de las neuronas, lo que se traduce en la formación astrocitos reactivos con pérdida de funcionalidad y una consecuente afectación neuronal (Crisp *et al.*, 2013; Nakamae *et al.*, 2015; Kobatake *et al.*, 2017). La ganancia de función tóxica de la proteína SOD1 mutante se ve justificada por el estrés del retículo endoplasmático ante la respuesta de proteína desplegada producida en este orgánulo, que aumenta la producción de chaperonas, llegando a generar una activación de vías de apoptosis celular (Yokota *et al.*, 2018). La UPR inicial de los astrocitos origina la producción de sustancias proinflamatorias que consecuentemente sugiere una migración y acúmulo de la

microglía en las zonas más afectadas (Yokota *et al.*, 2018). Existe también una participación de los oligodendrocitos, además de los astrocitos, en la homeostasis y el aporte energético de las neuronas. Se ha demostrado que en la MDC existe una disminución en la expresión de genes relacionados con la producción de mielina en los oligodendrocitos, esto supone una degradación y disfuncionalidad de los mismos, que consecuentemente produce una alteración de la homeostasis de las motoneuronas (Golubczyk *et al.*, 2019).

En base a lo descrito anteriormente, se puede sugerir que los mecanismos de degradación de las motoneuronas en la MDC se ven influenciados por multitud de mecanismos fisiopatológicos, comenzando por la acumulación intracitoplasmática de SOD1 mutante (Fig. 6). Todo esto supone un avance en la comprensión de los mecanismos fisiopatológicos de la enfermedad, no obstante, aún son necesarias más investigaciones para esclarecer su etiopatogenia.

Respecto al pronóstico y tratamiento de la MDC, varios estudios han demostrado que la fisioterapia intensiva, diaria y controlada aumenta el tiempo de supervivencia y enlentece la progresión de la enfermedad (Kathmann *et al.*, 2006; Coates and Wininger, 2010; Marques, 2018). Asimismo, se están investigando otros tratamientos coadyuvantes como la fotobiomodulación, que sugieren efectos beneficiosos en combinación con la fisioterapia (Miller, Torracca and De Taboada, 2020). Aunque la literatura basada en la evidencia sobre el tratamiento de la ELA está mucho más desarrollada que en el caso de la MDC, la investigación sobre nuevos tratamientos en la enfermedad canina podría extenderse a la ELA humana y viceversa.

8. CONCLUSIONES

Los conceptos y conclusiones extraídos de esta revisión bibliográfica son los siguientes:

- 1) La MDC es una enfermedad neurodegenerativa progresiva de pronóstico grave cuyo único tratamiento aplicable hasta el momento es de tipo paliativo, a través de la fisioterapia y algunos procedimientos coadyuvantes.
- 2) Las mutaciones del gen SOD1 canino parecen suponer la causa primaria del desarrollo de MDC, encuadrándose en un modelo hereditario autosómico recesivo de penetrancia incompleta.

- 3) Los mecanismos fisiopatológicos de la MDC indican una ganancia de función tóxica de la proteína mutante SOD1 canina, fundamentada principalmente en el estrés del retículo endoplasmático de las células del SNC ante una respuesta de proteína desplegada.
- 4) Las mutaciones en el gen SOD1 canino, entendidas como un importante factor de riesgo para el desarrollo de la MDC, así como una herramienta para su diagnóstico, pueden conducir a estrategias de cría de la especie canina que promuevan una disminución en la incidencia de la enfermedad.
- 5) El diagnóstico de una enfermedad, así como la predisposición de un individuo a padecerla, pueden verse facilitados en gran medida por la detección de marcadores genéticos o biomarcadores relacionados.
- 6) Las enfermedades neurodegenerativas caninas pueden servir como modelo animal de investigación de algunas enfermedades neurodegenerativas humanas como la ELA.
- 7) Aún se necesitan más investigaciones para comprender de forma precisa la etiopatogenia de la MDC y su relación con las mutaciones del gen SOD1.

CONCLUSIONS

After the literature review of this Final Degree Project, the following conclusions can be drawn:

- 1) CDM is a progressive neurodegenerative disorder with a fatal prognosis whose only effective treatment is a palliative one, through physical therapy and some adjuvant treatments.
- 2) Canine SOD1 gene mutations seem to be the main cause of CDM occurrence. The genetic model of this disease is an autosomic recessive pattern of inheritance with an incomplete penetrance.
- 3) The pathophysiological mechanisms of CDM indicate a gain of toxic function of the canine SOD1 mutant protein, mainly based on stress of the endoplasmic reticulum of CNS cells in response to an unfolded protein response.
- 4) Mutations in the canine SOD1 gene, understood as an important risk factor for the development of DCM, as well as a tool for its diagnosis, may lead to breeding strategies in the canine species that promote a decrease in the incidence of the disease.
- 5) Genetic markers and related biomarkers can be used to support diagnosis and risk factors in different diseases.
- 6) Canine neurodegenerative disorders serve as animal models for the research of some human neurodegenerative diseases as ALS.

- 7) More research is needed to understand the accurate pathogenic mechanisms of CDM and SOD1 implications.

9. VALORACIÓN PERSONAL:

La elaboración de este TFG ha resultado útil y francamente enriquecedora para mi formación universitaria en el Grado en Veterinaria. Durante su realización he ampliado mis conocimientos en el campo de la neurología, así como reforzado algunos conceptos relacionados con las ramas de la genética y la bioquímica. Asimismo, he adquirido mayores habilidades para desenvolverse en la búsqueda de información verídica en diferentes formatos de fuentes bibliográficas, que me han permitido aumentar mis capacidades para identificar artículos basados en la evidencia científica, lo que considero competencias fundamentales a adquirir para el desarrollo de la profesión.

En mi futura trayectoria profesional como veterinario, además de fisioterapeuta, los conocimientos adquiridos en el desarrollo y análisis de esta revisión bibliográfica me resultarán de gran utilidad para el ejercicio de la profesión, especialmente en la comprensión de fundamentos teóricos y su aplicación práctica en el campo de la neurología de pequeños animales, área por la que siempre he mostrado gran interés y en la cual pretendo especializarme.

Por último, quiero agradecer a Marta M^a Pérez Rontomé su apoyo y asesoramiento durante la realización de este proyecto.

10. BIBLIOGRAFÍA:

Al-Chaer, E. D., Westlund, K. N. and Willis, W. D. (1997) 'Nucleus gracilis: An integrator for visceral and somatic information', *Journal of Neurophysiology*, 78(1), pp. 521–527. doi: 10.1152/jn.1997.78.1.521.

Averill, D. R. (1973) 'Degenerative myelopathy in the aging German shepherd dog: clinical and pathologic findings', *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 162(12), pp. 1045–1051.

Awano, T. *et al.* (2009) 'Genome-wide association analysis reveals a SOD1 mutation in canine degenerative myelopathy that resembles amyotrophic lateral sclerosis', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(8), pp. 2794–2799. doi: 10.1073/pnas.0812297106.

Banks, C. J. and Andersen, J. L. (2019) 'Mechanisms of SOD1 regulation by post-translational modifications', *Redox Biology*. Elsevier B.V., p. 101270. doi: 10.1016/j.redox.2019.101270.

Barclay, K. B. and Haines, D. M. (1994) 'Immunohistochemical evidence for immunoglobulin and complement deposition in spinal cord lesions in degenerative myelopathy in German shepherd dogs.', *Canadian journal of veterinary research = Revue canadienne de recherche vétérinaire*, 58(1), pp. 20–24. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/pmc1263654/> (Accessed: 17 April 2021).

Benkler, C. *et al.* (2018) 'Aggregated SOD1 causes selective death of cultured human motor neurons', *Scientific Reports*, 8(1). doi: 10.1038/s41598-018-34759-z.

Bichsel, P. *et al.* (1983) 'Degenerative myelopathy in a family of Siberian Husky dogs.', *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 183(9).

Boeykens, F. *et al.* (2020) 'Genetic insights in canine degenerative myelopathy', *Vlaams Diergeneeskundig Tijdschrift*. Universiteit Gent, pp. 253–261. doi: 10.21825/VDT.V89I5.16951.

Boillée, S., Vande Velde, C. and Cleveland, D. W. W. (2006) 'ALS: A Disease of Motor Neurons and Their Nonneuronal Neighbors', *Neuron*. Neuron, pp. 39–59. doi: 10.1016/j.neuron.2006.09.018.

Calvo, A. C. *et al.* (2014) 'Amyotrophic Lateral Sclerosis: A Focus on Disease Progression', *BioMed Research International*. Hindawi Publishing Corporation. doi: 10.1155/2014/925101.

Caulkins, S. E., Purinton, P. T. and Oliver, J. E. (1989) 'Arterial supply to the spinal cord of dogs and cats.', *American journal of veterinary research*, 50(3), pp. 425–430. Available at: <https://europepmc.org/article/med/2930032> (Accessed: 24 April 2021).

Clemmons, R. M. (1992) 'Degenerative myelopathy.', *The Veterinary clinics of North America. Small animal practice*, 22(4), pp. 965–971. doi: 10.1016/S0195-5616(92)50087-0.

Coates, J. R. *et al.* (2007) 'Clinical Characterization of a Familial Degenerative Myelopathy in Pembroke Welsh Corgi Dogs', *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 21(6), pp. 1323–1331. doi: 10.1111/j.1939-1676.2007.tb01955.x.

Coates, J. R. and Wininger, F. A. (2010) 'Canine degenerative myelopathy', *Veterinary Clinics of North America - Small Animal Practice*. Vet Clin North Am Small Anim Pract, pp. 929–950. doi: 10.1016/j.cvsm.2010.05.001.

Cohen, N. R. *et al.* (2019) 'Nonnative structure in a peptide model of the unfolded state of superoxide dismutase 1 (SOD1): Implications for ALS-linked aggregation', *Journal of Biological Chemistry*, 294(37), pp. 13708–13717. doi: 10.1074/jbc.RA119.008765.

Crisp, M. J. *et al.* (2013) 'Canine degenerative myelopathy: Biochemical characterization of superoxide dismutase 1 in the first naturally occurring non-human amyotrophic lateral sclerosis model', *Experimental Neurology*, 248, pp. 1–9. doi: 10.1016/j.expneurol.2013.05.009.

Dewey, C. and Costa, R. Da (2015) *Practical guide to canine and feline neurology*. Available at: https://books.google.es/books?hl=es&lr=&id=JSWJCgAAQBAJ&oi=fnd&pg=PR7&dq=Practical+guide+to+canine+and+feline+neurology&ots=TG9sWd_Slj&sig=eVPmEbruLchOCi7I-nR_ob8ZKLg (Accessed: 22 March 2021).

Fechner, H. *et al.* (2003) 'Molecular genetic and expression analysis of α -tocopherol transfer protein mRNA in German shepherd dogs with Degenerative Myelopathy', *Berliner und Munchener Tierarztliche Wochenschrift*, 116(1–2), pp. 31–36. Available at: <https://europepmc.org/article/med/12592926> (Accessed: 17 April 2021).

Golubczyk, D. *et al.* (2019) 'The Role of Glia in Canine Degenerative Myelopathy: Relevance to Human Amyotrophic Lateral Sclerosis', *Molecular Neurobiology*, 56(8), pp. 5740–5748. doi: 10.1007/s12035-019-1488-3.

Griffiths, I. R. and Duncan, I. D. (1975) 'Chronic degenerative radiculomyelopathy in the dog', *Journal of Small Animal Practice*, 16(1–12), pp. 461–471. doi: 10.1111/j.1748-5827.1975.tb05773.x.

Hardiman, O. *et al.* (2017) 'Amyotrophic lateral sclerosis', *Nature Reviews Disease Primers*. Nature Publishing Group. doi: 10.1038/nrdp.2017.71.

Hashimoto, K. *et al.* (2021) 'Up-regulated inflammatory signatures of the spinal cord in canine degenerative myelopathy', *Research in Veterinary Science*, 135, pp. 442–449. doi: 10.1016/j.rvsc.2020.11.001.

Holder, A. L. *et al.* (2014) 'A retrospective study of the prevalence of the canine degenerative myelopathy associated superoxide dismutase 1 mutation (SOD1:c.118G > A) in a referral population of German Shepherd dogs from the UK', *Canine Genetics and Epidemiology*, 1(1), p. 10. doi: 10.1186/2052-6687-1-10.

Hsieh, Y. L. *et al.* (2012) 'Low-level laser therapy alleviates neuropathic pain and promotes function recovery in rats with chronic constriction injury: Possible involvements in hypoxia-inducible factor 1 α (HIF-1 α)', *Journal of Comparative Neurology*, 520(13), pp. 2903–2916. doi: 10.1002/cne.23072.

Imounan, F. *et al.* (2012) 'Vitamin E in ataxia and neurodegenerative diseases: A review', *World Journal of Neuroscience*, 02(04), pp. 217–222. doi: 10.4236/wjns.2012.24033.

Ivansson, E. L. *et al.* (2016) 'Variants within the SP110 nuclear body protein modify risk of canine degenerative myelopathy', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 113(22), pp. E3091–E3100. doi: 10.1073/pnas.1600084113.

Kathmann, I. *et al.* (2006) 'Daily controlled physiotherapy increases survival time in dogs with suspected degenerative myelopathy', *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 20(4), pp. 927–932. doi: 10.1892/0891-6640(2006)20[927:DCPIST]2.0.CO;2.

Kinsley, L. and Siddique, T. (1993) *Amyotrophic Lateral Sclerosis Overview*, GeneReviews®. University of Washington, Seattle. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20301623> (Accessed: 23 May 2021).

Kobatake, Y. *et al.* (2017) 'Localization of a mutant SOD1 protein in E40K-heterozygous dogs: Implications for non-cell-autonomous pathogenesis of degenerative myelopathy', *Journal of the Neurological Sciences*, 372, pp. 369–378. doi: 10.1016/j.jns.2016.10.034.

March, P. A. *et al.* (2009) 'Degenerative myelopathy in 18 Pembroke Welsh Corgi dogs', *Veterinary Pathology*, 46(2), pp. 241–250. doi: 10.1354/vp.46-2-241.

Marques, J. (2018) *Abordagem da neuroreabilitação funcional em cães com mielopatia degenerativa*. Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias.

Masoumipoor, M. *et al.* (2014) 'Effects of 660- and 980-nm low-level laser therapy on neuropathic pain relief following chronic constriction injury in rat sciatic nerve', *Lasers in medical science*, 29(5), pp. 1593–1598. doi: 10.1007/s10103-014-1552-1.

Miller, L. al., Torracca, D. G. and De Taboada, L. (2020) 'Retrospective Observational Study and Analysis of Two Different Photobiomodulation Therapy Protocols Combined with Rehabilitation Therapy as Therapeutic Interventions for Canine Degenerative Myelopathy', *Photobiomodulation, Photomedicine, and Laser Surgery*. Mary Ann Liebert Inc., pp. 195–205. doi: 10.1089/photob.2019.4723.

Morales, C. and Montoliu, P. (2012) *Neurología canina y felina*. Edited by Multimédica. Sant Cugat de Vallés.

Nakamae, S. *et al.* (2015) 'Accumulation and aggregate formation of mutant superoxide dismutase 1 in canine degenerative myelopathy', *Neuroscience*, 303, pp. 229–240. doi: 10.1016/j.neuroscience.2015.06.066.

Nakata, K. *et al.* (2019) 'Plasma microRNA miR-26b as a potential diagnostic biomarker of degenerative myelopathy in Pembroke welsh corgis', *BMC Veterinary Research*, 15(1). doi: 10.1186/s12917-019-1944-3.

Nakata, K. *et al.* (2021) 'Up-regulated spinal microRNAs induce aggregation of superoxide dismutase 1 protein in canine degenerative myelopathy', *Research in Veterinary Science*, 135, pp. 479–485. doi: 10.1016/j.rvsc.2020.11.018.

Ogawa, M. *et al.* (2011) 'Immunohistochemical observation of canine degenerative myelopathy in two Pembroke Welsh Corgi dogs', *Journal of Veterinary Medical Science*, 73(10), pp. 1275–1279. doi: 10.1292/jvms.11-0097.

Ogawa, M. *et al.* (2014) 'Neuronal Loss and Decreased GLT-1 Expression Observed in the Spinal Cord of Pembroke Welsh Corgi Dogs With Canine Degenerative Myelopathy', *Veterinary Pathology*, 51(3), pp. 591–602. doi: 10.1177/0300985813495899.

Ogawa, M. *et al.* (2015) 'Expression of Autophagy-Related Proteins in the Spinal Cord of Pembroke Welsh Corgi Dogs With Canine Degenerative Myelopathy', *Veterinary Pathology*, 52(6), pp. 1099–1107. doi: 10.1177/0300985815570070.

Oji, T. *et al.* (2007) 'Measurement of myelin basic protein in the cerebrospinal fluid of dogs with degenerative myelopathy', *Veterinary Clinical Pathology*, 36(3), pp. 281–284. doi: 10.1111/j.1939-165X.2007.tb00225.x.

Oliver, J. E., Lorenz, M. D. and J.N., K. (2003) *Manual de neurología veterinaria*. Tercera. Edited by G. I. Multimedia.

Ouahchi, K. *et al.* (1995) 'Ataxia with isolated vitamin E deficiency is caused by mutations in the α -tocopherol transfer protein', *Nature Genetics*, 9(2), pp. 141–145. doi: 10.1038/ng0295-141.

Pasinelli, P. and Brown, R. H. (2006) 'Molecular biology of amyotrophic lateral sclerosis: Insights from genetics', *Nature Reviews Neuroscience*. Nat Rev Neurosci, pp. 710–723. doi: 10.1038/nrn1971.

Pellegrino, F. C. (2013) 'Mielopatía degenerativa: estado actual de conocimiento.', *an. Vet. (Murcia)*, 29, pp. 63–86. Available at: <https://revistas.um.es/analesvet/article/view/209001> (Accessed: 12 March 2021).

Polizopoulou, Z. S. *et al.* (2008) 'Evaluation of a proposed therapeutic protocol in 12 dogs with tentative degenerative myelopathy', *Acta Veterinaria Hungarica*, 56(3), pp. 293–301. doi: 10.1556/AVet.56.2008.3.3.

Ramesh, T. *et al.* (2010) 'A genetic model of amyotrophic lateral sclerosis in zebrafish displays phenotypic hallmarks of motoneuron disease', *DMM Disease Models and Mechanisms*, 3(9–10), pp. 652–662. doi: 10.1242/dmm.005538.

Shafie, I. N. F. (2013) *The Establishment of Potential Cerebrospinal Fluid Biomarkers for Canine Degenerative Myelopathy School of Veterinary Medicine, PhD thesis, University of Glasgow*. Available at: <http://theses.gla.ac.uk/id/eprint/4292> (Accessed: 17 April 2021).

Shelton, G. D. *et al.* (2012) 'Degenerative myelopathy associated with a missense mutation in the superoxide dismutase 1 (SOD1) gene progresses to peripheral neuropathy in Pembroke Welsh Corgis and Boxers', *Journal of the Neurological Sciences*, 318(1–2), pp. 55–64. doi: 10.1016/j.jns.2012.04.003.

Thomas, E. V. *et al.* (2017) 'Transfer of pathogenic and nonpathogenic cytosolic proteins between spinal cord motor neurons in vivo in chimeric mice', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 114(15), pp. E3139–E3148. doi: 10.1073/pnas.1701465114.

Toedebusch, C. M. *et al.* (2017) 'Cerebrospinal Fluid Levels of Phosphorylated Neurofilament Heavy as a Diagnostic Marker of Canine Degenerative Myelopathy', *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 31(2), pp. 513–520. doi: 10.1111/jvim.14659.

Vandevelde, M. *et al.* (1978) 'Dysmyelination of the central nervous system in the Chow-Chow

dog', *Acta Neuropathologica*, 42(3), pp. 211–215. doi: 10.1007/BF00690359.

Wininger, F. A. *et al.* (2011) 'Degenerative Myelopathy in a Bernese Mountain Dog with a Novel SOD1 Missense Mutation', *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 25(5), pp. 1166–1170. doi: 10.1111/j.1939-1676.2011.0760.x.

Yokota, S. *et al.* (2018) 'Activation of the unfolded protein response in canine degenerative myelopathy', *Neuroscience Letters*, 687, pp. 216–222. doi: 10.1016/j.neulet.2018.09.040.

Zeng, R. (2013) *Molecular genetic studies in canine inherited diseases including neonatal cerebellar ataxia, degenerative myelopathy and multiple system degeneration*. University of Missouri. Available at: <https://mospace.umsystem.edu/xmlui/handle/10355/37874> (Accessed: 24 April 2021).