

## **MIELOPATÍA DEGENERATIVA: ESTADO ACTUAL DEL CONOCIMIENTO. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA**

Degenerative myelopathy: current state of knowledge. Literatura review

**Pellegrino, F. C.<sup>1\*</sup>**

<sup>1</sup>Facultad de Ciencias Veterinarias, Area Anatomía. Universidad de Buenos Aires. Av. Chorroarín 280 (1427) Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina.

**\*Autor para correspondencia:** Fernando Pellegrino. E-mail: fernando.pellegrino@speedy.com.ar

Historial del artículo:

Recibido: 25 noviembre 2013

Aceptado: 13 marzo 2014

### **RESUMEN**

La Mielopatía Degenerativa canina (MD) es una enfermedad neurodegenerativa de comienzo tardío, diagnosticada inicialmente en el Pastor Alemán, pero que afecta muchas otras razas. Se manifiesta como un desorden medular en los perros adultos, de inicio insidioso y curso lentamente progresivo.

Muchos estudios consideraron la posible etiología de MD sin poder esclarecer sus causas. Investigaciones recientes identificaron como causa probable una mutación del gen *SOD1* que codifica la Superóxido Dismutasa 1, lo que implica que MD es un potencial ortólogo de la Esclerosis Lateral Amiotrófica (ELA) del ser humano.

La distribución de las lesiones y la progresión clínica de MD son similares a los de ciertos tipos de ELA, con un inicio caracterizado por signos de motoneurona superior, con lesiones predominantes en la médula de la región torácica, con progresión a signos de motoneurona inferior, que se vuelven evidentes en los estadios tardíos de la enfermedad.

Antes de establecer una clara equivalencia entre DM y ELA, deben explicarse algunas diferencias entre ambas enfermedades. Por ejemplo, que en MD la axonopatía es difusa (y no restringida al cordón lateral, como en ELA) e involucra a los tractos sensitivos y motores y que, salvo comunicaciones aisladas, no hay evidencia de lesión neuronal en cerebro ni en tronco encefálico.

Mientras tanto, los perros con MD son potenciales modelos animales para ELA, que pueden ser usados para investigar los procesos subyacentes de la degeneración de la motoneurona, mapear los loci modificadores e identificar factores ambientales que influyen en la severidad de la enfermedad.

**Palabras clave:** Mielopatía degenerativa; Pastor Alemán; Mutación *SOD1*; Esclerosis Lateral Amiotrófica; Enfermedad de Motoneurona.

## ABSTRACT

Canine Degenerative myelopathy (DM) is a late-onset neurodegenerative, first diagnosed in German Shepherd, but affects multiple dog breeds. DM manifests as a spinal disorder in adult dogs, insidious onset and slowly progressive course.

Many studies considered the possible etiology of DM unable to clarify the causes. Recent researches have identified as a likely cause a mutation of the *SOD1* gene encoding superoxide dismutase 1 (SOD1), which also implies DM is a potential ortholog of Amyotrophic Lateral Sclerosis (ALS) of the human being.

The distribution of lesions and the clinical progression of MD are similar to those reported for certain types of ALS, with an onset characterized by upper motor neuron signs, with predominant lesions in the spinal thoracic region, with progression to lower motor neuron signs that become evident in the later stages of the disease.

Before establishing a clear equivalence between DM and ALS must explain some differences between two diseases. For example, in DM the axonopathy is diffuse (not restricted to lateral funiculus, as in ALS) and involves both sensory tracts as motors. Furthermore, except isolated communications, no evidence of neuronal damage in the brain or brain stem has been demonstrated.

Meanwhile, the dogs affected by DM are potential animal models for ALS, which can be used to probe the underlying processes of motor neuron degeneration, to map the modifier loci and identify the environmental factors which influence the severity of the disease.

**Key words:** Degenerative myelopathy; German Shepherd; *SOD1* mutation; Amyotrophic Lateral Sclerosis; Neuron motor disease.

## ANTECEDENTES HISTÓRICOS

La MD fue descrita por primera vez por Averill en 1973, quien la caracterizó como un síndrome de ataxia progresiva de los miembros pelvianos con debilidad asimétrica, afectando más comúnmente a perros Pastor Alemán adultos y viejos (Averill 1973). La MD fue formalmente atribuida a los efectos de la osificación dural espinal (ODE), aunque no se ha hallado la referencia original de esta especulación (Shafie 2013). Sin embargo, la ODE se encuentra en el 65% de los perros mayores de 2 años, de los cuales solamente el 23% presenta signos crónicos de ataxia y debilidad de los miembros pelvianos (Hoerlein 1978). Sumado a esto, los estudios de Averill realizados en 7 perros Pastor Alemán demostraron que la ocurrencia de ODE no tenía correlación ni con los signos clínicos ni con la localización de los cambios histopatológicos medulares que caracterizan a la MD (Averill 1973). El estudio patológico del grupo de perros afectados por MD reveló degeneración masiva de axones y de mielina con astrocitosis y gliosis en varios segmentos

de la médula espinal, más notorios en la región torácica media. Solamente en 2 de los perros se observaron anomalías radiculares, consistentes en pérdida de axones individuales y de la vaina de mielina en las raíces dorsales de nervios torácicos. Adicionalmente, en la mayoría de los perros examinados también se detectó la presencia de espondilosis, protrusión de discos intervertebrales y ODE en las regiones C3-T1 y L1-L6, aunque la localización neuroanatómica de estos trastornos no tenía correlación con los signos clínicos observados. El rango de edad de los perros afectados fue de 6 a 11 años. Las anomalías estaban restringidas a los miembros pelvianos, con grados variables de paraparesia y debilidad, y reflejos patelares incrementados. La nueva condición descrita fue denominada *Mielopatía Degenerativa*, basada en los hallazgos clínicos y patológicos (Averill 1973).

En 1975, Griffiths y Duncan publicaron una comunicación de MD enfocada en las características clínicas, electrofisiológicas y patológicas de la enfermedad. En general, los hallazgos fueron similares a los de Averill, excepto por

el mayor compromiso de las raíces dorsales de los nervios espinales que presentaron los perros afectados. Propusieron entonces la denominación de *Radiculomielopatía Degenerativa Crónica* (Griffiths y Duncan 1975). Debido a la inconsistencia de las lesiones en las raíces dorsales en estudios subsecuentes y a la fuerte predisposición racial, años más tarde se sugirió el nombre de *Mielopatía Degenerativa del Pastor Alemán* para esta enfermedad (Braund y Vandavelde 1978).

En vista de la cantidad de términos propuestos y teniendo en cuenta la cantidad de razas que pueden verse afectadas, la denominación de MD parece ser la más adecuada.

## ETIOLOGÍA Y PATOGÉNESIS

### Breve reseña histórica

Un gran número de estudios han considerado la posible etiología de MD, sin poder esclarecer las causas subyacentes de esta enfermedad. Sin embargo, el reciente descubrimiento de una mutación en el gen *SOD1* ha provocado un punto de inflexión (Awano *et al.* 2009). Antes de la identificación de la alteración genética que resulta en la mutación de la proteína SOD1 y la consecuente alteración de su función, MD había sido asociada con numerosas etiologías incluyendo deficiencias nutricionales y defectos autoinmunes.

En los inicios, MD fue atribuida a la ocurrencia de ODE, especulando con que las múltiples placas óseas en la duramadre pudieran provocar compresión de las raíces nerviosas, resultando en definitiva en un cuadro de paraparesia progresiva (Shafie 2013). Sin embargo, esta hipótesis fue refutada cuando se demostró que la ocurrencia de ODE era incidental y no tenía relación con los cambios patológicos que presentaban los perros con paraparesia (Averill 1973). También se descartó la hipótesis vascular, que consideraba las lesiones isquémicas como las responsables de los cambios degenerativos medulares, en base al inicio y la progresión de MD y a la distribución de sus lesiones (Averill 1973), muy distintas a los de las patologías vasculares.

rativos medulares, en base al inicio y la progresión de MD y a la distribución de sus lesiones (Averill 1973), muy distintas a los de las patologías vasculares.

También se exploró la potencial similitud de MD con la mielopatía asociada a deficiencia de vitamina B12 de los humanos (degeneración subaguda combinada –DSC–), en base al patrón de degeneración progresiva que afecta a los segmentos medulares torácicos, común a ambas patologías. Sin embargo, las características patológicas de DSC son generalmente irregulares o multifocales, a diferencia de MD, en la que las lesiones son topográficamente continuas. DSC afecta principalmente a la médula espinal, pero sus efectos sobre el cerebro y los nervios periféricos son la razón para el término «combinada». Sus manifestaciones neurológicas se atribuyen a un defecto en la metilación del ácido metilmalónico. En un estudio realizado en 6 perros Pastor Alemán afectados por DM (Williams *et al.* 1984), las mediciones séricas de los niveles de vitamina B12 resultaron subnormales en 3 de ellos. En el mismo estudio se relacionó la hipovitaminosis B12 con la ocurrencia de enfermedad del intestino delgado, presente en los perros afectados. Se especuló que la enteropatía podría ser responsable del desarrollo de las lesiones degenerativas, producto de la malabsorción de nutrientes esenciales. Sin embargo, la administración parenteral de cobalamina no es capaz de revertir la evolución clínica de MD (Johnston *et al.* 2000; Polizopolou *et al.* 2008).

También se ha descrito una asociación entre MD y deficiencia de vitamina E, en base a una condición que causa trastornos medulares en los humanos, conocida como ataxia asociada a deficiencia de vitamina E (AADVE). AADVE se ha asociado con mutaciones en el gen que codifica la proteína de transferencia del  $\alpha$ -tocoferol ( $\alpha$ -PTT). La falla en la función de la proteína mutante resulta en alteraciones en la retención del  $\alpha$ -tocoferol de la vitamina E (Ouahchi *et al.* 1995). Los bajos niveles séricos de  $\alpha$ -tocoferol provocan la acumulación de radicales libres de

oxígeno que eventualmente contribuyen a la degeneración neuronal en la médula espinal, tronco encefálico y nervios periféricos (Imounan *et al.* 2012). En un estudio (Williams *et al.* 1985) los niveles séricos de vitamina E en perros afectados por MD fueron inferiores a los de perros controles; los autores sugirieron que la enteropatía que habían hallado en estudios previos (Williams *et al.* 1984) podría ser responsable de la malabsorción de  $\alpha$ -tocoferol con el subsecuente desarrollo de MD. En otro estudio se midieron los niveles séricos de  $\alpha$ -tocoferol en 25 Pastor Alemán afectados por MD y en 46 perros sanos (20 Pastor Alemán y 26 de otras razas) (Johnston *et al.* 2001). La concentración sérica media de los perros afectados fue significativamente mayor que la de los sanos (46.4  $\mu\text{mol/l}$  y 34.2  $\mu\text{mol/l}$ , respectivamente), aunque no significativamente mayor que la de los Pastor Alemán sanos (37.3  $\mu\text{mol/l}$ ). La secuenciación del ADN complementario de la  $\alpha$ -PTT canina no reveló diferencias en la secuencia de nucleótidos ni de aminoácidos (Fechner *et al.* 2003). Además, tampoco se hallaron diferencias en los niveles de ARN mensajero de la  $\alpha$ -PTT entre los Pastor Alemán afectados y los perros controles. Esos hallazgos sugieren que la función anormal de la  $\alpha$ -PTT no es un factor contribuyente al desarrollo de MD. Adicionalmente, la terapia con vitamina E no modifica en absoluto el curso de la enfermedad (Polizopolou *et al.* 2008).

También se consideró una etiología tóxica, debido a que las lesiones de MD eran indicativas de una axonopatía distal o tipo muerte retrógrada confinada al SNC, basado en la degeneración del tracto corticospinal. Se sugirió que la longitud de las fibras nerviosas de las razas afectadas podría incrementar su susceptibilidad (Griffiths y Duncan 1975). Las axonopatías tipo muerte retrógrada ocurren inicialmente en la porción distal de las fibras más largas y de mayor diámetro, y gradualmente se propagan hacia la porción proximal para alcanzar el cuerpo neuronal. Son típicamente simétricas y generalmente ocurren en forma secundaria a una

afección metabólica o tóxica que interrumpe el transporte axonal. En contra de esta hipótesis se argumentó que la distribución de las lesiones en MD no correspondía al patrón clásico de la axonopatía tipo muerte retrógrada, ya que las alteraciones en los perros afectados por MD resultan principalmente en la degeneración asimétrica de tractos inespecíficos de sustancia blanca y, son discontinuas (Braund y Vandeveldel 1978). Por otra parte, el patrón distal/proximal explicaría el compromiso de los tractos motores, pero no el de las vías propioceptivas en la región torácica de la médula espinal, ni la ausencia de alteraciones en la parte distal de estos tractos, en el tronco encefálico y cerebelo (March *et al.* 2009).

Estudios posteriores del tronco encefálico de perros afectados por DM (Johnston *et al.* 2000) describieron degeneración y pérdida neuronal, y astrogliosis en la región del cuerno dorsal de la sustancia gris medular en el sitio que se origina el tracto espinocerebeloso dorsal. En base a estos hallazgos, los autores sugirieron que la enfermedad podría resultar de una neuronopatía que provocaba un defecto en el transporte axonal, lo que también se ha propuesto para ELA. Sin embargo, esas mismas lesiones no pudieron ser identificadas por otros investigadores (March *et al.* 2009).

Se ha sugerido también que el patrón de las lesiones de degeneración axonal y mielínica concurrentes con presencia de macrófagos es similar a la degeneración tipo walleriana (Averill 1973, March *et al.* 2009). Si bien este patrón ha sido descrito en las raíces dorales de los nervios espinales (Griffiths y Duncan 1975), la topografía de las lesiones en MD no sustenta la degeneración tipo walleriana (Coates y Winger 2010). La severidad del daño en los segmentos torácicos es sugestiva de una vulnerabilidad selectiva de esta región medular (Braund y Vandeveldel 1978; Johnston *et al.* 2000), que se ha atribuido a las características anatómicas de las arterias radicales torácicas (Caulkins *et al.* 1989).

En la década del '80, diferentes grupos de investigadores consideraron el papel del sistema inmune en la MD (Waxman *et al.* 1980b). En un trabajo fue evaluada la respuesta de los linfocitos periféricos a determinados mitógenos (moléculas que inducen la mitosis de los linfocitos) en 7 perros Pastor Alemán afectados por MD. Se observó marcada disminución en la respuesta proliferativa de los linfocitos de sangre periférica a mitógenos timo-dependientes como la concanavalina A y la fitohemaglutinina P. La supresión de la actividad celular fue detectada en los perros más severamente afectados, pero no fue observada en aquellos medianamente afectados. En contraste, los leucocitos esplénicos y los de los linfonódulos desarrollaban una respuesta normal, lo que condujo a hipotetizar que un agente presente en la sangre periférica causaba la linfo-supresión. En investigaciones posteriores utilizando la misma población de perros afectados, la disminución de la respuesta proliferativa de linfocitos periféricos fue asociada con una célula supresora aberrante en la sangre periférica, que podría ser mediada por la liberación de prostaglandinas (Waxman *et al.* 1980a). Los autores especularon que dicha célula supresora podría ser activada secundariamente por el huésped, resultando en una respuesta autoinmune para MD, aunque esta teoría aún no ha sido probada y en la actualidad se considera improbable (Lorenz *et al.* 2012). La autoinmunidad constituye un estado de reactividad del sistema inmunitario adaptativo frente a los antígenos propios, debido a una insuficiencia o pérdida de los mecanismos que en condiciones normales son responsables de la autotolerancia. La estimulación antigénica persistente debida a un defecto del sistema inmune para erradicar patógenos y la consecuente respuesta inflamatoria crónica, es la principal causa de autoinmunidad en pacientes con inmunodeficiencia primaria. Otros mecanismos inmunopatogénicos posibles consisten en defectos en el desarrollo, el número o las funciones de las células T reguladoras; alteraciones en el aclaramiento de in-

munocomplejos por deficiencias del sistema de complemento; desregulación en la proliferación homeostática secundaria a linfopenia; y factores genéticos, como alelos de HLA comunes que predisponen tanto a autoinmunidad como a inmunodeficiencia (Goyal *et al.* 2009).

La hipótesis de la causa inmunomediada fue también investigada evaluando la distribución de inmunoglobulina G (IgG) y del componente 3 del complemento (C3) en la médula espinal de 5 perros afectados por MD y en un perro sano (Barclay y Haines 1994). Por medio de análisis inmunohistoquímicos se evaluó tejido medular obtenido de varias regiones, y se observó incremento de IgG y de la tinción para C3 en los perros afectados, asociado con áreas de mayor vascularización, proximales a las lesiones de MD. También se hallaron depósitos extravasculares de IgG y C3 a lo largo de los bordes periféricos del cordón dorsal y ventral, que se correspondían con las áreas de mayor desmielinización. Este tipo de depósitos también se encontró en regiones sin lesiones ni vascularización. El tejido medular del perro sano también presentó incremento de la tinción en las regiones asociadas con vasos sanguíneos (Barclay y Haines 1994). Este estudio, sumado a la depresión de la respuesta inmune mediada por células y los infiltrados de células plasmáticas en riñones e intestino de perros afectados, sugirió la posibilidad de una destrucción inmunomediada en la patogénesis de la MD (Clemmons 1992). Sin embargo, no existen trabajos conclusivos en cuanto a la existencia de antígenos específicos, y tampoco se pudo establecer si los antígenos que desencadenan la reacción inmunomediada son exógenos o endógenos. Un estudio realizado en perros Welsh Corgi demostró ausencia de linfocitos T y B, e inmunorreactividad mínima o ausente para C3 en la médula espinal de los individuos afectados (March *et al.* 2009).

La alta incidencia de MD en razas específicas sugiere indudablemente una base genética (Braund y Vandeveld 1978; Bichsel *et*

al. 1983). La primera especulación acerca de la participación de un factor genético en MD, considerada en base a la fuerte predisposición de los Pastor Alemán a la enfermedad, fue hecha en 1978 (Braund y Vandeveldel 1978). Este concepto no fue retomado sino hasta el 2006, cuando un alelo *DLA-DRB1* en la región hipervariable 2 (HVR2) fue considerado como gen candidato, en base a que MD podría ser un ortólogo de la esclerosis múltiple progresiva primaria del humano (Clemmons *et al.* 2006). Se estableció que el alelo \*1101J de *DLA-DRB1* era homocigota en los Pastores Alemanes afectados por MD y heterocigota en los sanos. Sin embargo, en otro estudio (Clark *et al.* 2008), el análisis de la secuencia completa de 3 Pastores Alemanes homocigotas fracasó en reproducir los resultados genotípicos publicados previamente. Los autores concluyeron que el alelo mutante \*1101J no debería ser usado para predecir MD.

### **La identificación de la mutación genética *SOD1* en MD: un punto de inflexión en la comprensión de su etiopatogenia**

La hipótesis de la base genética para MD, aunque fuertemente sospechada (Braund y Vandeveldel 1978; Bichsel *et al.* 1983), no fue sustentada sino hasta el año 2007. En un estudio en el que se utilizó información genealógica de varios Welsh Corgi afectados por MD, pudo demostrarse una estrecha relación familiar para un numeroso linaje de 27 individuos enfermos (Coates *et al.* 2007).

La posibilidad que la etiología de MD tuviera un fuerte componente genético originó el desarrollo de estudios colaborativos multidisciplinarios, que obtuvieron un significativo progreso en la comprensión de la base genética de la MD con la confirmación de la mutación del gen canino *SOD1* en perros afectados por esta enfermedad, comparable a las mutaciones *SOD1* en ELA del humano (Awano *et al.* 2009). La mutación ocurre en el nucleótido 118 que

predice una transición de G a A en el exón 2 (*SOD1:c.118G>A*), resultando en una mutación de sentido erróneo E40K en *SOD1*. En la mutación E40K canina, como la E40G humana y las otras mutaciones ELA asociadas a *SOD1*, la lisina sustituye al glutamato en la posición correspondiente al aminoácido 40 de la secuencia de *SOD1*, provocando los cambios conformacionales que alteran su función. Mediante un mapeo de asociación genómica en 38 perros afectados y 17 controles Welsh Corgi se identificaron fuertes asociaciones en el cromosoma 31 (CFA31) en una región que contiene el gen *SOD1*. Este gen fue considerado un candidato regional debido a que, en humanos, la mutación del *SOD1* puede causar ELA. También fueron secuenciados para el alelo mutante A en *SOD1* otros 64 perros Welsh Corgi adicionales y 418 representantes de otras 4 razas (Pastor Alemán, Boxer, Ridgeback rodesiano y Retriever de la bahía de Chesapeake), en los que se demostró una asociación significativa entre el fenotipo MD y la homocigosis para el alelo A. El 96% de los perros con diagnóstico presuntivo de MD fueron confirmados como homocigotas A/A; sin embargo, el genotipo homocigota también fue detectado en 34% de los controles, ninguno de los cuales presentó signos de MD. Además, se encontró que la cantidad de homocigotas individuales en ciertas razas del grupo control (Welsh Corgi Pembroke 74%, Boxer 67%) era más elevada respecto a las otras (Pastor Alemán 25%, Ridgeback rodesiano 15% y Retriever de la bahía de Chesapeake 39%). El genotipo heterocigota A/G fue hallado en el 32% de los individuos del grupo control, contra un 2% del grupo de los perros afectados por MD. Este grupo sería un potencial portador del gen mutante *SOD1*. El 2% de los animales del grupo afectado y el 34% del grupo control resultaron normales, es decir, poseían el alelo primitivo G/G (Awano *et al.* 2009).

En forma posterior a la identificación de la mutación *SOD1* en MD, un estudio retrospectivo en una población remitida de perros Pastor

Alemán realizado en el Reino Unido demostró que el 76% de los animales afectados y el 24% de los controles eran homocigotas para el alelo mutante A (Adams *et al.* 2010). El porcentaje de heterocigotas en ese estudio resultó ser del 33%. El genotipo primitivo G/G estuvo presente en el 14% de los individuos afectados y en el 43% del grupo control.

En ambos estudios (Awano *et al.* 2009; Adams *et al.* 2010), hubo un considerable número de perros homocigotas para el alelo mutante en los grupos controles sin signos clínicos de MD. Las observaciones genéticas coinciden con la característica de una penetrancia incompleta, y la probabilidad que la enfermedad se transmita en forma autosómica recesiva (Awano *et al.* 2009). Esto difiere del modo de herencia autosómico dominante, típicamente observado en la ELA asociada a *SOD1*; sin embargo, en algunas familias humanas la isoforma de N90A *SOD1* se asocia con una herencia recesiva de ELA con penetrancia incompleta (Khoris *et al.* 2000; Andersen *et al.* 2006). En estos casos, la historia natural de la enfermedad de los humanos se parece mucho a la MD del perro (Awano *et al.* 2009).

En un estudio genético reciente se ha identificado otra mutación *SOD1* en un Boyero de Berna con diagnóstico histopatológico de MD. La resecuenciación de 5 exones *SOD1* reveló una mutación en el nucleótido 52 que predice una transición de A a T (*SOD1:c.52A>T*) resultando en una mutación de sentido erróneo T18S en *SOD1*. En esta otra mutación, la serina sustituye a la treonina en la posición correspondiente al aminoácido 18 en la secuencia de *SOD1* (Wininger *et al.* 2011).

En contraste al alelo *SOD1:c.118G>A*, que es muy frecuente en la población canina (hasta el momento se detectó en representantes de 124 razas o sus variedades), el alelo *SOD1:c.52A>T* parece estar restringido al Boyero de Berna (Wininger *et al.* 2011; Zeng 2013).

Investigaciones recientes caracterizaron las 2 proteínas mutantes caninas *SOD1* identifica-

das hasta el momento, la E40K y la T18S, y encontraron que estas especies mutantes insolubles en detergentes forman dímeros enzimáticamente activos que poseen una gran propensión a formar agregados en cultivos celulares (Crisp *et al.* 2013). Estos hallazgos dan fuerte sustento al rol tóxico de las isoformas de la proteína mutante en la MD canina. *SOD1* funciona como homodímero, catalizando la producción de radicales superóxido a peróxido de hidrógeno y oxígeno molecular, lo que la convierte en un mecanismo de defensa antioxidante celular. Las isoformas mutantes *SOD1* presentan una disminución de su carga neta negativa que las puede predisponer a la agregación debido a la reducción de las fuerzas Colúmbicas, o por aumento de la interacción con la superficies de membranas aniónicas (Sandelin *et al.* 2007). La neurodegeneración resultante de los cambios conformacionales en la proteína *SOD1* mutante se produce por la alteración de su actividad biológica y/o por la propensión a la formación de agregados intracelulares, que le confieren propiedades tóxicas (Nagai *et al.* 2001; Rothstein 2009). Los mecanismos de ganancia tóxica de *SOD1* que inducen la degeneración neuronal permanecen desconocidos, pero posiblemente involucren la interacción de varias vías moleculares (Rothstein 2009). En ELA, el daño inicial tiene lugar en el interior de las motoneuronas, aunque también compromete células no neuronales como las células de Schwann (Lobsiger *et al.* 2009) y los linfocitos T (Beers *et al.* 2008; Chiu *et al.* 2008). Por ese motivo, todos los mecanismos propuestos hasta el momento probablemente contribuyan a la patogénesis a través de la inducción de lesiones en diferentes tipos de células (Pasinelli y Brown 2006; Turner y Talbot 2008). La selectiva vulnerabilidad de las motoneuronas con la mutación *SOD1* permanece sin explicación, aunque puede estar relacionada a los requerimientos necesarios para mantener los largos axones motores y la demanda energética que insume el transporte axonal retro y anterógrado (Shaw y Egget 2000). Es claro

que las motoneuronas son muy sensibles al estrés oxidativo y a la disfunción mitocondrial, lo que incrementa su vulnerabilidad en relación a otros componentes celulares (Robberecht *et al.* 2000).

Estudios inmunohistoquímicos utilizando anticuerpos contra la proteína SOD1 indicaron la presencia de inclusiones citoplasmáticas, caracterizadas como grumos focales bien definidos en los cuerpos neuronales, sugestivos de agregados proteicos (Awano *et al.* 2009; Ogawa *et al.* 2011). Otros estudios han revelado colocalización de la proteína disulfuro-isomerasa (PDI) con inclusiones citoplasmáticas de SOD1 (Long *et al.* 2012). PDI representa una familia de chaperones enzimáticos que puede atenuar los efectos de la agregación de SOD1 mutante en la luz del retículo endoplasmático (RE). En células de mamíferos, la respuesta al estrés del RE (También conocida como respuesta a proteínas desplegadas RPD-) involucra la respuesta al gen *CHOP*, que está asociada a la mediación de la apoptosis, y la inducción de otros genes que codifican proteínas residentes del RE (como PDI, BiP o Grp78), cuya función es facilitar el correcto plegamiento de las proteínas y facilitar la degradación de las proteínas malformadas. Estas proteínas se han implicado en varias vías de señalización que se afectan en muchas enfermedades neurodegenerativas. En perros afectados por MD, en respuesta al estrés del RE, se ha observado una significativa sobreexpresión de RPD, PDI, *CHOP*, BiP y Grp78 en la médula espinal (Long *et al.* 2012). Estos hallazgos son similares a los comunicados en pacientes humanos con ELA y en modelos transgénicos que expresan el gen humano mutante *SOD1* (Atkin *et al.* 2008; Honjo *et al.* 2011), lo que indica que el estrés del RE es común a MD y ELA (Long *et al.* 2012).

En los estudios de Awano *et al.* (2009) y de Adams *et al.* (2010) hubo perros con signos clínicos consistentes con MD que no resultaron homocigotas para el alelo mutante *SOD1:c.118A*. Varias son las posibles expli-

caciones para este hecho (Zeng 2013): como el diagnóstico de MD no fue confirmado por histopatología en todos los casos, algunos de esos perros podrían haber sufrido una enfermedad compresiva adquirida. Por otra parte, la homocigosis para el alelo *SOD1:c.52T*, descrita posteriormente en un Boyero de Berna (Wininger *et al.* 2011), pudo haber sido la causa posible de enfermedad neurodegenerativa en otro perro de la misma raza en el que no se buscó esa mutación. En el resto de los individuos, la heterocigosis *SOD1:c.118G>A* pudo haber sido de algún modo la responsable del problema en algunos de ellos. No obstante, y a pesar de las especulaciones realizadas, las causas de la enfermedad neurodegenerativa en la mayoría de esos perros permanecieron desconocidas. Algunos de ellos podrían haber presentado mutaciones en genes caninos ortólogos de los genes humanos de ELA no asociados a *SOD1*, como por ejemplo *ALS2*, *SETX*, *VAPB*, *ANG*, *OPTN*, *FUS*, *TARDBP*, *DCTN1*, *MAPT*, *FIG4*, *SPG11*, *DAO*, *CHMP2B*, *PON1*, *PON2*, *PON3*, *VCP*, *GRN*, *CHRNA3*, *CHRNA*, *CHRN4* y *C9orf72*. Es posible que investigaciones futuras acerca de la genética molecular de estas enfermedades puedan conducir a la identificación de genes no reconocidos en la actualidad, que desarrollen mutaciones responsables tanto de MD como de ELA. Por lo tanto, las muestras de ADN de la subpoblación de perros no homocigotas para el alelo mutante *SOD1:c.118A* podrían ser un recurso valioso que facilite el descubrimiento de nuevas causas genéticas de MD, proporcionando nuevos modelos caninos de ELA para evaluar los mecanismos de la enfermedad y sus terapias potenciales (Zeng 2013).

En la actualidad existe un análisis de genotipo basado en la presencia de la mutación *SOD1:c.118G>A* que ha sido desarrollado por el grupo de investigación de la Universidad de Missouri. Esta prueba es usada en el diagnóstico de rutina de MD y para la detección en programas de cría selectiva. A la fecha se han realizado análisis de genotipo para esta muta-

ción en más de 33.500 perros de 223 razas o variedades, en los que la frecuencia del alelo A es de 0.37 (Zeng 2013).

## CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LA MIELOPATÍA DEGENERATIVA

### Reseña

MD se asocia comúnmente a razas grandes y sus cruza. La prevalencia general en la población canina es de 0.19%, con una prevalencia específica para el Pastor Alemán de 2.01% (Coates *et al.* 2007). Los casos de MD confirmada por histopatología han sido comunicados en Pastor Alemán (Averill 1973; Griffiths y Duncan 1975; Braund y Vandeveldel 1978; Johnston *et al.* 2000; Awano *et al.* 2009), Ridgeback rodesiano (Awano *et al.* 2009), Husky siberiano (Bichsel *et al.* 1983), Welsh Corgi Pembroke (Coates *et al.* 2007; March *et al.* 2009), Retriever de la bahía de Chesapeake (Awano *et al.* 2009; Long *et al.* 2009), Boxer (Awano *et al.* 2009; Miller *et al.* 2009), Caniche miniatura (Matthews y de Lahunta 1985), Boyero de Berna (Wininger *et al.* 2011), Caniche estándar (Coates y Wininger 2010), Terrier azul de Kerry (Coates y Wininger 2010), Corgi galés de Cardigan (Coates y Wininger 2010), Retriever dorado (Coates y Wininger 2010), Fox terrier pelo duro (Coates y Wininger 2010), Perro esquimal americano (Coates y Wininger 2010), Terrier trigueño de pelo suave (Coates y Wininger 2010), Pug (Coates y Wininger 2010), y perros mestizos (Averill 1973). Se han comunicado también casos de MD con diagnóstico presuntivo pero sin confirmación histopatológica en Setter irlandés (Griffiths y Duncan 1975), Labrador (Kathmann *et al.* 2006), Hovawart (Kathmann *et al.* 2006), Kuvasz (Kathmann *et al.* 2006), Collie (Kathmann *et al.* 2006), Ovejero belga (Kathmann *et al.* 2006), Schnauzer gigante (Kathmann *et al.* 2006), Mastiff (Kathmann *et al.* 2006), Borzoi (Kathmann *et al.* 2006), Gran danés (Polizopoulou *et al.* 2008)

y Cavalier King Charles Spaniel (Shafie 2013). Los gatos ocasionalmente se ven afectados por MD (Mesfin *et al.* 1980).

Si bien las razas de mediano y pequeño tamaño son raramente afectadas, evidencias recientes han revelado un sustancial número de perros Welsh Corgi Pembroke con MD, con una prevalencia racial de 0.58% (Coates *et al.* 2007; March *et al.* 2009). Otras razas pequeñas en las que se ha detectado MD incluyen Cavalier King Charles Spaniel (Shafie 2013), Fox terrier pelo duro (Coates *et al.* 2007) y un Caniche miniatura (Matthews y de Lahunta 1985). La alta prevalencia de MD en razas específicas sugiere que existe un factor genético que desempeñe un rol significativo en la etiología (Coates *et al.* 2007).

MD se asocia tradicionalmente con perros adultos o viejos, aunque hay una gran variación en la comunicación de las edades de aparición, desde los 6 meses (Longhofer *et al.* 1990) hasta los 15 años (Cherubini *et al.* 2008). Si bien existen unas pocas comunicaciones de perros jóvenes Pastor Alemán afectados por MD, la edad de inicio habitualmente es a los 5 años, con una edad media de 9 años en las razas grandes (Averill, 1973; Griffiths y Duncan, 1975; Johnston *et al.* 2000; Kathmann *et al.* 2006). En el Welsh Corgi Pembroke, la edad media de inicio comunicada es 11 años (Coates *et al.* 2007).

No existe predilección sexual para MD, aunque podría haber un efecto raza (Coates *et al.* 2007). Los Pastor Alemán machos están sobrerrepresentados en la mayoría de las comunicaciones (Averill, 1973; Griffiths and Duncan 1975; Johnston *et al.* 2000), pero en 2 estudios referidos a Welsh Corgi Pembroke se informó de una predominancia de hembras afectadas (Coates *et al.* 2007; March *et al.* 2009).

### Signos clínicos

La sospecha de MD se establece ante un cuadro de ataxia propioceptiva general de los miembros pelvianos y paraparesia con signos de MNS, de inicio insidioso, carácter progresivo

y frecuentemente asimétrico. Estas características, que han sido los pilares del diagnóstico clínico, provienen de las descripciones originales de MD en Pastor Alemán y otras razas grandes que eran eutanasiados en estadios tempranos del curso de la enfermedad (Averill, 1973; Griffiths y Duncan 1975; Braund y Vandeveld 1978). Los signos predominantes en estas primeras comunicaciones eran sugerentes de una lesión con neurolocalización toracolumbar (T3-L3). Con la progresión de la enfermedad, en su forma crónica se observa paraplejía con eventual compromiso de los miembros torácicos (Matthews y de Lahunta 1985; Coates *et al.* 2007; Awano *et al.* 2009; Kathmann *et al.* 2006). El mismo cuadro se ha descrito en Caniche miniatura y Welsh Corgi Pembroke (Matthews y de Lahunta 1985; Coates *et al.* 2007; Awano *et al.* 2009). En cualquiera de sus etapas, es importante destacar la ausencia de dolor espinal (Coates y Wininger 2010; Lorenz *et al.* 2012).

Las características clínicas de MD han sido bien documentados por varios autores (Averill 1973; Griffiths y Duncan 1975; Awano *et al.* 2009; Coates y Wininger 2010). El inicio es insidioso y se produce entre los 6 y los 9 años en las razas grandes, y más tarde en las de pequeño tamaño. Comienza con el arrastre de los dedos medios de uno o ambos miembros pelvianos, con evidencia de desgaste y sangrado de las garras (Johnston 1998; Cherubini *et al.* 2008). Con la progresión de la enfermedad se observan problemas para subir o bajar escaleras y para estimar las distancias (Johnston *et al.* 2001). En este estadio es frecuente el cruzamiento de los miembros pelvianos al caminar y los movimientos de balanceo de la pelvis (Lorenz *et al.* 2012). Aunque el compromiso afecta ambos miembros pelvianos, las asimetrías son frecuentes (Coates *et al.* 2007; Coates y Wininger 2010).

El curso de la enfermedad puede variar desde el inicio de los signos clínicos, progresando a una paraparesia no ambulatoria entre los 6 y los 9 meses en las razas grandes, con un promedio de duración de unos 6 meses (Averill

1973; Braund y Vandeveld 1978; Johnston *et al.* 2000). En este estadio, los propietarios generalmente optan por la eutanasia. En contraste, los propietarios de las razas pequeñas suelen acompañar a su mascota en el curso de la enfermedad, asistiéndola por mayor cantidad de tiempo (Matthews y de Lahunta 1985; Coates *et al.* 2007; Coates y Wininger 2010). De acuerdo a esto, el promedio de duración de MD en el Welsh Corgi Pembroke es de 19 meses. Como resultado del mayor tiempo de sobrevida, los perros afectados muestran frecuentemente signos de paresia de los miembros torácicos al momento de la eutanasia (Coates *et al.* 2007; Coates y Wininger 2010; Lorenz *et al.* 2012).

En la actualidad se distinguen 2 etapas en la progresión de MD, que pueden superponerse parcialmente: una temprana (entre los 6 y 12 meses) y una tardía (entre los 9 y 18 meses aproximadamente) (Coates *et al.* 2007; Awano *et al.* 2009; Coates y Wininger 2010; Lorenz *et al.* 2012; Shafie 2013).

En la *etapa temprana* la propiocepción consciente está afectada de forma uni o bilateral, dependiendo de la severidad de la enfermedad (Griffiths y Duncan 1975). El examen de los reflejos espinales sugiere enfermedad de MNS, con el reflejo patelar normal o exagerado. En aproximadamente el 10% de los casos puede haber hiporreflexia patelar (Griffiths y Duncan 1975); sin embargo, esta disminución del reflejo podría estar relacionada con la edad (Coates y Wininger 2010). En la mayoría de los perros afectados el reflejo flexor suele ser normal, o mostrar simultáneamente reflejo extensor cruzado (signo de MNS). La función urinaria e intestinal suelen estar preservadas (Coates y Wininger 2010). La progresión de la enfermedad no es una constante, y en unos pocos perros los signos clínicos pueden estabilizarse después de la fase aguda (Shafie 2013). Sin embargo, la mayoría progresa a paraparesia no ambulatoria y, especialmente los perros de razas grandes, suelen ser eutanasiados (Matthews y de Lahunta 1985; Coates *et al.* 2007; Coates y Wininger

2010; Lorenz *et al.* 2012). En esta etapa las conclusiones obtenidas a partir del examen neurológico, como se ha mencionado, indican una lesión localizada en los segmentos medulares T3-L3 (Averill 1973; Coates *et al.* 2007; Awano *et al.* 2009; Lorenz *et al.* 2012).

En la *etapa tardía* los signos clínicos cambian y el examen neurológico sugiere una lesión de Motoneurona Inferior (MNI), con frecuente compromiso ascendente que involucra también a los miembros torácicos (Averill 1973; Matthews y de Lahunta 1985; Kathmann *et al.* 2006; Coates *et al.* 2007; Awano *et al.* 2009; Lorenz *et al.* 2012; Shafie 2013). La paraparesia se hace más simétrica y evoluciona a tetraplejía flácida, con atrofia muscular neurogénica e hiporreflexia, que se desarrollan entre los 9 y los 18 meses desde el inicio de la enfermedad (Coates *et al.* 2007; Awano *et al.* 2009; Coates y Wininger 2010; Shafie 2013). El compromiso de los miembros torácicos se verifica entre los 14 y los 24 meses desde la aparición de los primeros signos (Shafie 2013). La severa y extensa atrofia de los músculos apendiculares que se observa en esta etapa se ha atribuido al desuso (Averill 1973; Griffiths y Duncan 1975; Bichsel *et al.* 1983; Matthews y de Lahunta 1985; Coates *et al.* 2007), aunque la flaccidez en los perros con enfermedad crónica sugiere fuertemente que la atrofia es por denervación (Awano *et al.* 2009; Coates y Wininger 2010; Lorenz *et al.* 2012). Si el perro no es eutanasiado, también pueden presentarse signos de tronco encefálico, tales como dificultad para tragar e incapacidad de ladrar, que suelen aparecer entre los 24 y los 36 meses de comenzada la enfermedad (Matthews y de Lahunta 1985; Coates *et al.* 2007; Awano 2009; Coates y Wininger 2010; Lorenz *et al.* 2012; Shafie 2013). La alteración de los esfínteres no es un signo clínico habitual, aun en el estadio final asociado a paraplejía (Averill 1973; Bichsel *et al.* 1983; Kathmann *et al.* 2006; Coates *et al.* 2007; Coates y Wininger 2010; Lorenz *et al.* 2012). Sin embargo, en algunos individuos se ha comunicado la presencia de incontinencia

urinaria y fecal (Kathmann *et al.* 2006; Coates *et al.* 2007; Coates y Wininger 2010), lo que se ha asociado a lesiones en el cordón dorsal de las regiones toracolumbar y lumbosacra de la médula espinal que comprometen las vías sensoriales de distensión colorrectales y vesicales (Al-Chaer *et al.* 1996). La interrupción de dichas vías podría contribuir a la ausencia de retroalimentación sensorial hacia los centros encefálicos, que resulta en la pérdida de la sensación consciente de distensión visceral, con la eventual evacuación involuntaria de heces u orina. Sin embargo, la observación clínica de incontinencia urinaria también podría reflejar un signo de MNS en la vía de la micción. Para aclarar este hecho es preciso realizar mayor cantidad de estudios acerca de las alteraciones que produce MD en los segmentos sacros y sus raíces (Coates y Wininger 2010).

La causa de muerte natural en MD no está determinada, debido a que los perros afectados suelen ser eutanasiados cuando sobreviene la paraparesia no ambulatoria. Sin embargo, en los estadios finales de la enfermedad se ha observado una dificultad respiratoria que potencialmente podría llevar a una falla respiratoria (Vasquez 2011). Estas observaciones son coincidentes con los cambios patológicos que se han identificado recientemente en los músculos intercostales de perros afectados por MD (Morgan *et al.* 2013).

## APROXIMACIÓN AL DIAGNÓSTICO

### Diagnóstico diferencial

La presentación clínica inicial de un síndrome medular de comienzo insidioso que indica una localización toracolumbar T3-L3 es idéntica a muchas otras patologías espinales o vertebrales. Como MD afecta predominantemente perros adultos, predispuestos a numerosos problemas ortopédicos y neurológicos, la potencial presencia de otras condiciones puede afectar la interpretación del examen neurológico.

gico (Braund 1987; Coates y Winger 2010; Lorenz *et al.* 2012). En las etapas más tempranas, cuando las deficiencias neurológicas son sutiles, el diagnóstico diferencial debe incluir enfermedades ortopédicas (displasia de cadera, ruptura de ligamentos cruzados, enfermedad degenerativa articular) o patologías abdominales caudales (enfermedad prostática, hernia perineal). Cuando los signos neurológicos se vuelven más evidentes se debe considerar la presencia de herniación discal protrusiva, compresión medular dorsal por espondilosis de las facetas articulares, formaciones quísticas sinoviales de la cápsula articular, neoplasias espinales o procesos infecciosos (Hoerlein 1978; Cherubini *et al.* 2008; Coates y Winger 2010).

El trastorno neurológico más común que puede afectar a perros adultos de razas grandes y que puede simular una MD es la protrusión discal por enfermedad discal Hansen tipo II, aunque en las razas condrodistróficas que también pueden padecer MD, como el Welsh Corgi Pembroke la extrusión discal por enfermedad discal Hansen tipo I es más probable (Coates y Winger 2010). La ausencia de dolor es un dato clínico importante para orientar el diagnóstico hacia MD (Coates y Winger 2010; Lorenz *et al.* 2012).

En un paciente con enfermedad medular crónica, especialmente en razas predispuestas como el Pastor Alemán, el diagnóstico de MD basado exclusivamente en los signos clínicos es inespecífico y no más probable que el de enfermedad discal protrusiva (Coates y Winger 2010; Lorenz *et al.* 2012). Los estudios por imágenes y el análisis de líquido cefalorraquídeo (LCR) pueden incrementar el grado de sospecha. Sin embargo, el diagnóstico definitivo requiere la confirmación histopatológica (Coates y Winger 2010).

### Diagnóstico clínico

El diagnóstico clínico de MD es un verdadero desafío debido a que el espectro de sig-

nos clínicos que presenta es común a muchas enfermedades, y a la ausencia de una prueba complementaria específica (Coates y Winger 2010; Shafie 2013). Un diagnóstico ante mortem adecuado se basa en la reseña y en el reconocimiento del inicio y del patrón de progresión de los signos clínicos, acompañado del cumplimiento de una serie de etapas diagnósticas para excluir otras patologías (Braund 1987; Coates y Winger 2010). Las técnicas complementarias más utilizadas incluyen el análisis de LCR, las pruebas electrodiagnósticas y los métodos por imágenes. A menudo, el diagnóstico presuntivo de MD se establece en base a la ausencia de una mielopatía compresiva clínicamente relevante, determinada por mielografía o mediante imágenes por resonancia magnética (IRM) (Coates y Winger 2010).

La IRM es especialmente útil para identificar trastornos intramedulares tempranos o para evidenciar compresiones extradurales, como las que se producen en la enfermedad discal protrusiva. Sin embargo las imágenes, especialmente en perros añosos, revelan frecuentemente protrusiones discales que pueden confundir el diagnóstico de MD. Se deben evaluar minuciosamente tales alteraciones en el contexto del cuadro clínico y considerar particularmente la rapidez de la progresión de la enfermedad, la presencia de hiperestesia paraespinal y el volumen de médula comprimida para poder estimar la implicancia clínica del trastorno compresivo (Coates y Winger 2010). Por estos motivos, las imágenes en general no suelen aportar información concluyente en el diagnóstico de MD, excepto cuando se caractericen por la ausencia de hallazgos positivos (Cherubini *et al.* 2008).

En base a la hipotética presencia de células supresoras en sangre periférica que causarían una respuesta deprimida a mitógenos (Waxman *et al.* 1980b) se desarrolló la prueba de linfoproliferación *in vitro* como método complementario para MD. Esta prueba evalúa la inmunidad mediada por células, por cuantifi-

cación de la respuesta de linfocitos periféricos frente al estímulo de mitógenos inespecíficos. La multiplicación de las células puede ser detectada por incorporación de precursores de ADN como la timidina marcada con isótopos radiactivos, que permite obtener valores normales para la especie, expresados como índices de estimulación. Esta prueba es inespecífica, y en un estudio se comunicó que fracasó 2 veces en confirmar el diagnóstico de la enfermedad, realizada con unos meses de diferencia, ante una MD verificada posteriormente por histopatología (Romatowski 1984). La prueba de linfoproliferación *in vitro* no se ha mantenido en el tiempo para el diagnóstico de MD, y se utiliza en el contexto de los trastornos gastrointestinales inmunomediados asociados en los Ovejeros alemanes (*com. pers.* Coates, julio 2013).

El análisis de LCR puede contribuir a la exclusión de enfermedades inflamatorias o infecciosas. En perros con MD no suelen observarse anomalías de ningún tipo (Coates *et al.* 2007), aunque en ocasiones puede encontrarse disociación albuminocitológica (Cherubini *et al.* 2008).

Los resultados de las pruebas electrodiagnósticas varían de acuerdo al estadio de la enfermedad (Griffiths y Duncan 1975; Kathmann *et al.* 2006; Coates *et al.* 2007; Awano *et al.* 2009; Coates y Wininger 2010). Al inicio del cuadro clínico no se encuentra ningún tipo de alteración (Awano *et al.* 2009; Coates y Wininger 2010). En estadios avanzados, a partir de los 14 meses aproximadamente, el electromiograma muestra actividad espontánea multifocal en la musculatura apendicular distal, manifestada fundamentalmente por potenciales de fibrilación y ondas agudas positivas (Awano *et al.* 2009; Coates *et al.* 2007; Coates y Wininger 2010). En relación a la electroneurografía, el registro de los potenciales de acción musculares compuestos (onda M) luego de estimular el nervio tibial y el ulnar, muestra dispersión temporal y disminución de la amplitud. La ve-

locidad de conducción nerviosa motora se encuentra disminuida (Awano *et al.* 2009). Estos hallazgos proveen evidencia de axonopatía en los nervios motores y de desmielinización, que ocurren en los estadios tardíos de MD (Coates y Wininger 2010).

### **Identificación de posibles biomarcadores como ayuda al diagnóstico clínico**

La caracterización de biomarcadores específicos y seguros para MD podrían ayudar al diagnóstico clínico y mejorar la comprensión de los mecanismos de la enfermedad, además de permitir el seguimiento de los ensayos terapéuticos (Coates y Wininger 2010; Shafie 2013). Desgraciadamente, no existen en la actualidad biomarcadores específicos para MD, aunque se ha comunicado que la presencia de determinados marcadores genéticos es indicadora de un riesgo incrementado de padecer la enfermedad (Awano *et al.* 2009; Wininger *et al.* 2011).

En un estudio que utilizó tomografía computada y mielografía en perros con sospecha de MD se identificaron otros trastornos espinales concurrentes que se observan con mayor frecuencia en los perros afectados que en los sanos, tales como estenosis del canal vertebral, protrusiones discales, atenuación focal del espacio subaracnoideo, deformación y disminución del tamaño de la médula espinal, y atrofia de la musculatura episomática (Jones *et al.* 2005). Sin embargo, ninguna de esas características es específica de MD sumado al hecho que, en ese estudio, en ninguno de los perros afectados el diagnóstico fue confirmado mediante histopatología.

Muchos estudios han evaluado proteínas seleccionadas en el LCR de perros afectados por MD en busca de la identificación de biomarcadores específicos de respuesta inmune. En un trabajo se evaluó la formación intratecal de inmunoglobulinas utilizando la técnica de clasificación isoeléctrica seguida de inmunofijación en LCR de perros afectados por MD.

Se identificaron bandas oligoclonales de inmunoglobulinas en 4 perros, pero su significación es cuestionable porque su presencia se detectó también en 2 perros sanos (Ruax *et al.* 2003). Otro estudio evaluó las concentraciones de proteína total, IgG y la relación proteína total/IgG para evidenciar la síntesis intratecal de IgG en 6 perros Pastor Alemán afectados por MD, pero no encontraron diferencias con el grupo control (Kamishina *et al.* 2008).

En otro trabajo se detectaron concentraciones aumentadas de proteína básica de la mielina (PBM), utilizando una prueba de inmunoensayo para humanos (Oji *et al.* 2007). Las concentración de PBM en LCR en perros Pastor Alemán afectados por MD fue significativamente mayor que en perros sanos, lo que sugiere la presencia de desmielinización activa en MD, que podría ocurrir secundariamente a la degeneración axonal. Esta prueba, aunque es de utilidad para los trastornos desmielinizantes de los perros, no es específica para MD.

En otro estudio realizado en una serie de perros Welsh Corgi Pembroke afectados por MD ligados familiarmente, se midieron las concentraciones de 8-isoprostano, un derivado de la peroxidación del ácido araquidónico que ha sido considerado un marcador estable y seguro para evaluar el estrés oxidativo en trastornos neurológicos de los humanos (Montuschi *et al.* 2004). Sin embargo, sus concentraciones no se encontraron afectadas en los perros afectados por MD en relación con perros adultos sanos. Una posible explicación es que la cantidad de 8-isoprostano no refleje realmente el proceso de enfermedad activa (Coates *et al.* 2007).

En la actualidad se está investigando el desarrollo de otros biomarcadores más específicos en LCR. Estudios recientes indican que la clusterina es el biomarcador candidato más viable para MD. Esta proteína se encuentra significativamente elevada en el LCR de perros con MD cuando se compara con otras enfermedades neurológicas. El segundo candidato potencial como biomarcador para MD es la transtirretina

(TTR), que se encuentra reducida en el LCR de los perros afectados, de manera similar a lo que ocurre en humanos con ELA. La relación de estas proteínas con los mecanismos fisiopatogénicos que conducen a MD no está esclarecida, aunque es razonable especular que sus alteraciones están asociadas a la toxicidad que resulta de la mutación de la proteína SOD1 (Shafie 2013).

Un estudio reciente describió el desarrollo de la técnica de estimación del número de unidades motoras (MUNE, de la sigla en inglés) en perros (Vasquez 2011). Es un método electrofisiológico usado comúnmente en humanos para monitorear la progresión de ELA, en el que la activación de las unidades motoras se realiza por estimulación eléctrica, y la estimación se hace mediante un análisis estadístico (Boe *et al.* 2007; Shefner *et al.* 2007). Se han establecido los rangos de normalidad en perros sanos y, en la actualidad, se están realizando estudios longitudinales para estimar la pérdida de motoneuronas inferiores en perros afectados por MD (*com. pers.* Coates, Julio 2013).

### Análisis genético

En 2009 se comunicó que los perros con MD confirmada por histopatología eran homocigotas para una mutación de sentido erróneo en el exón 2 del *SOD1* canino, *SOD1:c.118G>A*, que predice una transición de G a A en el nucleótido 118 en la SOD1 (Awano *et al.* 2009). En la actualidad existe una prueba de ADN comercialmente disponible basada en esta mutación, desarrollada por el grupo de investigación de la Universidad de Missouri. Sin embargo, debe tenerse en cuenta que la identificación en un individuo de la homocigosis para el alelo mutante, aunque eleva el índice de sospecha para ese animal en particular, no provee un diagnóstico específico debido a que una proporción de perros homocigotas para la mutación *SOD1* no desarrollan MD (Awano *et al.* 2009; Zeng 2013).

## HALLAZGOS HISTOPATOLÓGICOS

La confirmación de la existencia de MD se realiza a partir de los hallazgos histopatológicos (Coates *et al.* 2007; Awano *et al.* 2009; Coates y Winger 2010; Winger 2011). Adicionalmente, este tipo de estudios puede contribuir a esclarecer la fisiopatología de esta enfermedad. A pesar del creciente conocimiento de la asociación genética en ELA, los mecanismos subyacentes y la patología resultante aún no está del todo esclarecida ni para la enfermedad humana ni para la MD canina (Coates y Winger 2010; Al-Chalabi *et al.* 2012). Uno de los mayores impedimentos para elucidar los mecanismos patológicos en ELA es la escasa disponibilidad de tejidos para estudiar, generalmente obtenidos pos mortem. En consecuencia, las descripciones de la progresión de la enfermedad son exiguas (Fischer *et al.* 2004). En contraste, los perros afectados por MD son eutanasiados en distintos estadios de enfermedad, y los tejidos pueden ser obtenidos para evaluar la progresión de la patología (Morgan *et al.* 2013).

### Histopatología de la médula espinal

Por muchos años se pensó que MD era una enfermedad que involucraba en forma primaria solamente a los tractos medulares ascendentes y descendentes, y fue descrita como una axonopatía central restringida a la médula espinal (Averill 1973; Griffiths y Duncan 1975; Braund y Vandeveld 1978). En el inicio del cuadro clínico los resultados del estudio de los reflejos espinales son consistentes con enfermedad de motoneurona superior (MNS). En esta etapa temprana, los cambios patológicos son más evidentes en la médula de la región torácica, pero con la evolución se extienden craneal y caudalmente y se hacen más severos a medida que la enfermedad progresa (Averill 1973; March *et al.* 2009). Los cambios histopatológicos en la médula espinal de los perros afectados por MD son consistentes con una degeneración axonal

no inflamatoria con desmielinización consecuente (Averill 1973; Griffiths y Duncan 1975; Braund y Vandeveld 1978; Coates y Winger 2010). Los cambios degenerativos son extensos y han sido comunicados en los tractos ascendentes y descendentes de todos los cordones medulares (Averill 1973; Griffiths y Duncan 1975; Coates *et al.* 2007). Sin embargo, son más prominentes en el cordón lateral, afectando el tracto espinocerebeloso dorsal, el corticoespinal, el reticuloespinal y el rubroespinal (Averill 1973; Griffiths y Duncan 1975; Braund y Vandeveld 1978; March *et al.* 2009). Las lesiones en el cordón dorsal tienden a localizarse medialmente, en el interior del fascículo grácil (Averill 1973; Griffiths y Duncan 1975; March *et al.* 2009). También se han comunicado alteraciones en el cordón ventral, situados principalmente alrededor de la fisura ventromediana (Shafie 2013). Las lesiones en la sustancia gris son moderadas. Se ha comunicado la presencia de astrogliosis y cromatólisis en el núcleo torácico y en el núcleo del tracto espinocerebeloso dorsal (columna de Clark) (Johnston *et al.* 2000), que muy raramente aparecen en otras regiones (Griffiths y Duncan 1975; Johnston *et al.* 2000).

La descripción de las lesiones denota una degeneración axonal segmentaria y mielínica asociada (Coates y Winger 2010), más que una degeneración walleriana o tipo walleriana, que implica la fragmentación y disolución del axón en la zona distal al daño. La patología de MD involucra segmentos de axones en el interior de varios tractos, que pueden ser consistentes con un defecto en los astrocitos y/o oligodendrocitos, lo que impide el mantenimiento de la integridad axonal, o con un defecto en el transporte axonal anterógrado y retrógrado (March *et al.* 2009). La ausencia de esferoides impide categorizar las lesiones de MD como una distrofia neuroaxonal (Coates y Winger 2010).

Los perros con MD tienen patrones característicos de vacuolización axonal cilíndrica. La pérdida regional de axones suele ser muy

severa, y son reemplazados por extensas áreas de astrogliosis (Averill 1973; Griffiths y Duncan 1975; Johnston *et al.* 2000; March *et al.* 2009). Ocasionalmente se observan macrófagos en las áreas con restos axonales y mielínicos, que indican fragmentación de la mielina y fagocitosis, secundarias al proceso degenerativo (Averill 1973; Coates *et al.* 2007; March *et al.* 2009). Se demostró que los macrófagos CD18 positivos se encuentran moderadamente incrementados en los sitios donde la lesión es más pronunciada (March *et al.* 2009).

La distribución longitudinal de las lesiones varía a medida que la enfermedad progresa. En el Pastor Alemán las lesiones longitudinales son discontinuas, con áreas multifocales de fibras que muestran pérdida de mielina y degeneración axonal (Coates *et al.* 2007; Johnston *et al.* 2000). En el Welsh Corgi Pembroke y en otras razas pequeñas con MD, las lesiones son longitudinalmente continuas y se presentan mejor definidas en el interior de los cordones medulares (Matthews y de Lahunta 1985; March *et al.* 2009). Su extensión es mayor en comparación a las raza grandes (March *et al.* 2009). Los perros más severamente afectados muestran una degeneración axonal significativamente mayor en los segmentos medulares torácicos, con progresión hacia las regiones cervical y lumbar (March *et al.* 2009). Se ha sugerido que la región torácica posee una vulnerabilidad neuronal incrementada que puede contribuir a la patogénesis de MD. La misma podría estar causada por la disminución de la perfusión medular proveniente de las arterias radicales, que son de diámetro más pequeño en ese segmento (Caulkins *et al.* 1989). Las características anatómicas de la vascularización regional podrían predisponer al tejido nervioso a procesos isquémicos asociados al estrés oxidativo y a la excitotoxicidad. Sin embargo, la variabilidad de las lesiones que se observa entre las distintas razas, e inclusive en individuos de una misma raza, implica que podría haber variantes fenotípicas distintas de MD (March *et al.* 2009).

Hasta el año 2012, MD se clasificaba como una axonopatía central y periférica (Coates y Wininger 2010). Aunque se había comunicado la existencia de cromatólisis en la sustancia gris intermedia medular (Johnston *et al.* 2000), la pérdida de motoneuronas no había sido reconocida como una de las características de MD, a diferencia de lo que ocurre en ELA. Esta era una de los hechos que faltaba explicar y que establecían diferencias entre MD y ELA, impidiendo una clara equivalencia entre ambas enfermedades (Coates y Wininger 2010). En un trabajo reciente (Ogawa *et al.* 2014) se estudiaron los cambios neuronales y la expresión de los niveles del transportador de glutamato 1 (GLT-1) y del transportador de glutamato/aspartato (GLAST) en la médula espinal de 10 Welsh Corgi Pembroke (5 de ellos afectados por MD con la mutación *SOD1*, y 5 sanos) y 5 perros Beagle sin signos neurológicos. El trabajo se basó en la teoría de la muerte neuronal que ocurre en ELA a causa de la excitotoxicidad por glutamato, debida a una deficiencia del ciclo glutamina/glutamato. Los autores encontraron una significativa disminución del número de neuronas en el cuerno ventral de la sustancia gris medular en los perros afectados por MD, sin cambios en el tamaño de las células. También hallaron cromatólisis, neuronas cargadas de lipofuscina y una marcada disminución de la cantidad de sinapsis. La expresión de GLT-1 estaba marcadamente disminuida, sin cambios en la expresión del transportador de glutamato/aspartato GLAST. Los resultados indican que la excitotoxicidad por glutamato relacionada a la expresión reducida de GLT-1 puede estar involucrada en la pérdida neuronal observada en la MD, tal como sucede en ELA en los humanos, aunque los eventos intraneuronales pueden diferir entre ambas enfermedades (Ogawa *et al.* 2013).

### **Histopatología del cerebro**

La caracterización de las lesiones en el cerebro de perros afectados por MD ha sido muy

limitada hasta el momento (Coates y Winger 2010). Si bien las descripciones iniciales de los cambios patológicos de MD se restringían a la médula espinal, en el año 2000 se comunicaron las primeras alteraciones cerebrales (Johnston *et al.* 2000), consistentes en cromatólisis, neuronofagia y gliosis principalmente en el núcleo rojo, pero también en el vestibular lateral, y en los núcleos cerebelosos lateral (dentado) y medial (fastigio). Sin embargo, otros autores que examinaron el cerebro de perros con MD con microscopía óptica (Averill, 1973; Braund y Vandeveld, 1978; March *et al.* 2009) no hallaron tales lesiones.

### **Histopatología del Sistema Nervioso Periférico**

Tradicionalmente se ha afirmado que las lesiones de MD se restringían al SNC (Averill 1973; Griffiths y Duncan 1975). Los nervios periféricos, cuando fueron examinados, se describieron como normales o con pérdida esporádica de axones (Averill 1973; March *et al.* 2009), o con lesiones degenerativas en sus raíces dorsales (Griffiths y Duncan 1975).

En los últimos años, varias descripciones clínicas e histopatológicas indicaron que MD se extiende más allá de la médula espinal, al menos en los estadios avanzados, e involucra no solamente a los tractos medulares y a la MNI, sino también al axón y a la miofibra (Awano *et al.* 2009; Shelton *et al.* 2012). De este modo, la distribución de las lesiones y la progresión clínica de MD resultan similares a los comunicados para ciertos tipos de ELA, con un inicio caracterizado por signos de MNS en los perros afectados, con posterior progresión a signos de MNI (Brooks *et al.* 2000; Coates *et al.* 2007; Coates y Winger 2010).

Los signos de MNI se vuelven evidentes en estadios tardíos de la progresión de MD (Coates *et al.* 2007; Coates y Winger 2010). Un estudio reciente documentó anomalías en perros Boxer y Welsh Corgi Pembroke parapléjicos afectados por DM, consistentes en atro-

fía muscular con denervación y desmielinización de los nervios periféricos (Shelton *et al.* 2012). Se describió una marcada variabilidad en el tamaño de las miofibras con numerosas fibras atroficas. La pérdida de fibras y ovoides de mielina fueron evidentes en el interior de las ramas nerviosas intramusculares, hallazgos consistentes con degeneración tipo walleriana. En el nervio peroneo los hallazgos consistieron en pérdida masiva de fibras y fibrosis endoneural. Todos estos cambios se observan en estadios avanzados de enfermedad, aunque algunos perros Boxer en estadios intermedios de MD mostraron pequeños grupos de fibras atroficas en el bíceps femoral y en los gastrocnemios (Shelton *et al.* 2012).

En un estudio reciente (Morgan *et al.* 2013) se caracterizaron los cambios patológicos en los músculos intercostales de perros Boxer y Welsh Corgi Pembroke afectados por MD, en distintos estadios de progresión de la enfermedad. Los hallazgos consistieron en atrofia muscular, fibrosis, aumento de la variabilidad de la forma y tamaño de las fibras musculares, y alteración en la composición de los tipos de fibras. Estos cambios patológicos no se acompañaron de la retracción del complejo formado por las terminales de la motoneurona y los receptores de acetilcolina del músculo, lo que sugiere que la atrofia muscular no resulta de la denervación física (Morgan *et al.* 2013). Estos hallazgos proveen una mayor comprensión de los probables mecanismos que conducen a la falla respiratoria en ciertas formas de ELA, y podrían ser útiles para desarrollar potenciales medidas terapéuticas a partir del modelo MD.

### **TRATAMIENTO**

Los protocolos de tratamiento que han sido usados hasta el momento fueron empíricos, sin un enfoque basado en evidencia científica (Coates y Winger 2010). Por ese motivo, en la actualidad no existe certeza alguna de los efectos positivos de los tratamientos sintomáticos que

se han propuesto, y por lo tanto tampoco existe una modalidad terapéutica específica para el tratamiento de MD (Coates y Wininger 2010).

Se han utilizado diversas drogas inmunosupresoras, en base a la hipótesis inmunomediada en relación a la etiología de MD. Se emplearon glucocorticoides, ciclofosfamida y azatioprina, especulando que podrían enlentecer el proceso de deterioro en los perros afectados, aunque ninguna de estas drogas tuvo un efecto positivo en la progresión de la enfermedad (Clemmons 1992; Polizopolou *et al.* 2008). También se postuló que la utilización de un agente anti-proteasa, el ácido épsilon amino caproico (EACA), podía contribuir a aumentar los tiempos de evolución de MD (Clemmons 1991, 1992). Sin embargo, la evaluación de la eficacia al largo plazo de EACA y de N-acetilcisteína en combinación con la suplementación de vitaminas B, C y E en los perros afectados no mostró ningún tipo de efecto beneficioso (Polizopolou *et al.* 2008).

La fisioterapia ha sido recomendada tradicionalmente en los casos de MD. En un trabajo se investigó el efecto a largo plazo de la fisioterapia intensiva realizada por los propietarios de 22 perros afectados (Kathmann *et al.* 2006). El tiempo analizado fue desde la realización del diagnóstico presuntivo hasta el momento de la eutanasia. Todos los propietarios recibieron instrucciones detalladas acerca de la forma de realizar una adecuada rehabilitación, y el seguimiento fue hecho en forma telefónica. Los perros afectados que recibieron fisioterapia intensiva (ejercicios de marcha 3-5 veces al día, masajes y movimientos pasivos articulares 3 veces al día, o hidroterapia diaria) tuvieron un tiempo de supervivencia mayor (promedio 255 días) en comparación a aquellos que realizaron una fisioterapia moderada (ejercicios de marcha 3 veces al día, masajes o hidroterapia semanales; promedio de supervivencia 130 días), o no hicieron fisioterapia (promedio de supervivencia 55 días). En la actualidad se reconoce que la fisioterapia y la aplicación de los principios de la rehabilitación física pueden contribuir a mejorar la calidad de

vida de los perros afectados por MD, aunque no influyen en el pronóstico a largo plazo (Coates y Wininger 2010).

Hasta el presente no existe ningún tratamiento profiláctico o curativo para los humanos con ELA. Una droga de acción antiglutamato, el riluzole, puede aumentar la cantidad de vida en pacientes afectados (Bensimon *et al.* 1994). El riluzole bloquea preferencialmente los canales de sodio sensibles a tetrodotoxina (TTX) reduciendo el influjo de calcio y previniendo en forma indirecta la estimulación de los receptores de glutamato (Song *et al.* 1997). En un estudio se ha comunicado que una modalidad de atención con ventilación asistida, soporte nutricional mediante gastrotomía endoscópica percutánea y cuidados multidisciplinarios aporta un beneficio de supervivencia relativa del 45% (Van Damme y Robberecht 2009). En un ensayo experimental, la terapia de liberación de oligonucleótidos antisentido a la SOD1 por infusión continua intraventricular en ratones ELA redujo tanto la proteína SOD1 como los niveles de ARNm en el cerebro y la médula espinal, constituyéndose en el tratamiento que ha rendido el mayor beneficio hasta el momento (Smith *et al.* 2006). Otras estrategias en estudio consisten en terapia celular, incluyendo la utilización de células madre, progenitores neurales y células modificadas por ingeniería genética para producir factores tróficos (Nayak *et al.* 2006), y la inmunización pasiva a través de la infusión intraventricular de anticuerpos anti-SOD1 (Urushitani *et al.* 2007). De todos modos, al ser ELA un trastorno heterogéneo, requiere una estrategia multiterapéutica que incluya modificadores significativos de la enfermedad (Van Damme y Robberecht 2009).

## CONCLUSIONES

La MD es una enfermedad neurodegenerativa que afecta animales adultos, de comienzo insidioso y curso progresivo que afecta muchas razas de perros.

Los signos clínicos iniciales consisten en ataxia propioceptiva general y signos de MNS, con paraparesia espástica ambulatoria. Más tarde, los signos clínicos pueden avanzar hasta desarrollar tetraparesia flácida y otros signos de MNI.

El diagnóstico clínico de MD se establece en base a la reseña, a los signos clínicos y a la ausencia de hallazgos positivos en los exámenes complementarios. El diagnóstico definitivo se realiza mediante el examen histopatológico. Los cambios observados consisten en degeneración axonal y mielínica asociada en los tractos ascendentes y descendentes de todos los cordones medulares, degeneración tipo walleriana y desmielinización en los nervios periféricos, y atrofia muscular, fibrosis, aumento de la variabilidad de la forma y tamaño de las fibras musculares, y alteración en la composición de los tipos de fibras. Recientemente se comunicó una significativa disminución del número de neuronas en el cuerno ventral de la sustancia gris medular en los perros afectados por MD, sin cambios en el tamaño de las células.

En relación a su etiología, estudios genéticos han revelado dos mutaciones del gen canino *SOD1* en perros afectados por MD, *SOD1:c.118G>A* y *SOD1:c.52A>T*, que codifican la enzima SOD1. Las isoformas de la proteína SOD1 mutante, E40K y T18S, la predisponen a la formación de agregados intracelulares, que le confieren propiedades tóxicas. A diferencia de *SOD1:c.118G>A*, que se ha encontrado en representantes de 124 razas o sus variedades, la mutación *SOD1:c.52A>T* parece estar restringida al Boyero de Berna.

Sin embargo, existen algunos perros afectados por MD que no son homocigotas para el alelo mutante *SOD1:c.118G>A*. Se especula que podrían existir otras mutaciones en genes caninos ortólogos de los genes humanos de ELA no asociados a *SOD1* que estarían implicados en el etiopatogenia de la enfermedad.

En la actualidad existe una prueba de ADN comercialmente disponible basada en la muta-

ción *SOD1:c.118G>A*. La identificación en un individuo de la homocigosis para el alelo mutante, aunque eleva el índice de sospecha para ese animal en particular, no provee un diagnóstico específico debido a que una proporción de perros homocigotas para la mutación *SOD1* no desarrollan MD. Por este motivo, en la actualidad se está investigando el desarrollo de otros biomarcadores más específicos en LCR que sustenten el análisis genético. La clusterina parece ser el biomarcador candidato más viable para MD.

La identificación de la mutación *SOD1* ha establecido un enlace genético entre MD y ELA, que transforma a MD en el primer modelo animal espontáneo de ELA.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAMS J., CATCHPOLE B., HOLDER A., VOLK H. 2010. Prevalence of a superoxide dismutase 1 (*Sod1:c.118G>A*) in a referral population of German shepherd dogs from the UK. BSAVA Congress 2010 Scientific Proceedings: Veterinary Programme. (Abstract).
- AL-CHAER E.D., LAWAND N.B., WESTLUND K.N., WILLIS W.D. 1996. Pelvic visceral input into de nucleus gracilis is largely mediated by the postsynaptic dorsal column pathway. *J. Neurophysiol.*; 76:2675-90.
- AL-CHALABI A., JONES A., TROAKES C., KING A., AL-SARRAJ S., VAN DEN BERG L.H. 2012. The genetics and neuropathology of amyotrophic lateral sclerosis. *Acta Neuropathol.*; 124:339-352.
- ANDERSEN P.M. 2006. Amyotrophic lateral sclerosis associated with mutations in the CuZn superoxide dismutase gene. *Current Neurology and Neuroscience Reports.* 6:37-46.
- ATKIN J.D., FARG M.A., WALKER A.K., MCLEAN C., TOMAS D., HORNE M.K. 2008. Endoplasmic reticulum stress and in-

- duction of the unfolded protein response in human sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Neurobiology of Disease*; 30:400-407.
- AVERILL D.R. JR. 1973. Degenerative myelopathy in the aging German shepherd dog: clinical and pathologic findings. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*; 162:1045-1051.
- AWANO T., JOHNSON G. S., WADE C. M., KATZ M. L., JOHNSON G.C., TAYLOR, J. F., PERLOSKI M., BIAGI T., BARANOWSKA I., LONG S., MARCH P. A., OLBY N. J., SHELTON G. D., KHAN S., O'BRIEN D. P., LINDBLAD-TOH K., COATES, J. R. 2009. Genome-wide association analysis reveals a *SOD1* mutation in canine degenerative myelopathy that resembles amyotrophic lateral sclerosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*; 106: 2794-2799.
- BARCLAY K.B., HAINES D.M. 1994. Immunohistochemical evidence for immunoglobulin and complement deposition in spinal cord lesions in degenerative myelopathy in German Shepherd dogs. *Canadian J. Vet. Res.*; 58:20-24.
- BEERS D.R., HENKEL J.S., ZHAO W., WANG J., APPEL S.H. 2008. CD4+ T cells support glial neuroprotection, slow disease progression, and modify glial morphology in an animal model of inherited ALS. *Proceeding of the National Academy of Sciences*. 105:15558-15563.
- BENSIMON G., LACOMBLEZ L., MERININGER V. 1994. A control trial of riluzole. *N. Engl. J. Med.*; 330:585-91.
- BICHSEL P., VANDEVELDE M., LANG J. KULL-HACHLER S. 1983. Degenerative myelopathy in a family of Siberian husky dogs. *J.A.V.M.A.*; 183(9):998-1000.
- BOE S.G., STASHUK D.W., DOHERTY T.J. 2007. Motor unit number estimates and quantitative motor unit analysis in healthy subjects and patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Muscle Nerve*. 36:62-70.
- BRAUND K.G, VANDEVELDE M. 1978. German Shepherd dog myelopathy- a morphologic and morphometric study. *Am. J. Vet. Res.*; 39:1309-1315.
- BRAUND K.G. 1987. Hip dysplasia and degenerative myelopathy: making the distinction in dogs. *Vet. Med.*; 82:782-9.
- BROOKS B.R., MILLER R.G., SWASH M., MUNSAT T.L. 2000. El Escorial revisited: revised criteria for the diagnosis of amyotrophic lateral sclerosis. *Amyotroph. Lateral Scler. Other Motor Neuron. Disord.*; 1:293-299.
- CAULKINS S.E., PURINTON P.T., OLIVER J.E. 1989. Arterial supply to the spinal cord of dogs and cats. *Am. J. Vet. Res.*; 50(3):425-30.
- CHERUBINI G.B., LOWRIE M., ANDERSON T.J. 2008. Pelvic limb ataxia in the older dog 1. assessment and non-painful conditions. *In Practice*; 30, 386-391.
- CHIU I.M., CHEN A., ZHENG Y., KOSARAS B., TSIFTSOGLU S.A., VARTANIAN T.K., BROWN R.H. JR., CARROLL M.C. 2008. T lymphocytes potentiate endogenous neuroprotective inflammation in a mouse model of ALS. *Proceeding of the National Academy of Sciences*. 105:17913-17918.
- CLARK L.A., TSAI K.L., MURPHY K.E. 2008. Alleles of DLA-DRB1 are not unique in German Shepherd dogs having degenerative myelopathy. *Anim. Genet.*; 39:332.
- CLEMMONS R.M. 1991. Therapeutic considerations for degenerative myelopathy of German shepherds. In: *proceedings 9<sup>th</sup> ACVIM forum*. New Orleans (LA). pp 773-75.
- CLEMMONS R.M. 1992. Degenerative myelopathy. *Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract.*; 22:965-971.
- CLEMMONS R.M., CHEESEMAN J.A., KAMISHINA H., OJI, T. 2006. Genetic analysis of a spontaneous canine model of primary progressive multiple sclerosis. *The Journal of Federation of American Societies for Experimental Biology*. (Abstract).
- COATES J. R., MARCH P. A., OGLESBEE M., RUAUX C. G., OLBY N.J., BERGHAUS

- R. D., O'BRIEN D. P., KEATING J. H., JOHNSON G. S., WILLIAMS D. A. 2007. Clinical characterization of a familial degenerative myelopathy in Pembroke Welsh Corgi dogs. *J. Vet. Intern. Med.*; 21: 1323–1331.
- COATES J. R., WININGER F. A. 2010. Canine degenerative myelopathy. *Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract.*; 40: 929–950.
- CRISP M.J., BECKETT J., COATES J.R., MILLER T.M. 2013. Canine degenerative myelopathy: Biochemical characterization of superoxide dismutase 1 in the first naturally occurring non-human amyotrophic lateral sclerosis model. *Exp. Neurol.*; 248:1-9.
- FECHNER H., JOHNSTON P.E., SHARP N.J., MONTAGUE P., GRIFFITHS I.R., WANG X., OLBY N., LOOMAN A.C., POLLER W., FLEGEL T. 2003. Molecular genetic and expression analysis of alpha-tocopherol transfer protein mRNA in German shepherd dogs with degenerative myelopathy. *Berliner und Munchener Tierärztliche Wochenschrift*; 116:31-36.
- FISCHER L.R., CULVER D.G., TENNANT P., DAVIS A.A., WANG M., CASTELLANO-SANCHEZ A., KHAN J., POLAK M.A., GLASS J.D. 2004. Amyotrophic lateral sclerosis is a distal axonopathy: evidence in mice and man. *Exp. Neurol.*; 185:232–240.
- GOYAL R., BULUA A.C., NIKOLOV N.P., SCHWARTZBERG P.L., SIEGEL R.M. 2009. Rheumatologic and autoimmune manifestations of primary immunodeficiency disorders. *Curr. Opin. Rheumatol.*; 21:78-84.
- GRIFFITHS I.R., DUNCAN I.D. 1975. Chronic degenerative radiculomyelopathy in the dog. *J. Small Anim. Pract.*; 16:461–471.
- HOERLEIN B.F. 1978. General spinal disorders. En: *Canine neurology, diagnosis and treatment*, 3rd. ed. pp. 411-469. Ed: Hoerlein B.F. WB Saunders, Philadelphia.
- HONJO Y., KANEKOS., ITO H., HORIBE T., NAGASHIMA M., NAKAMURA M., FUJITA K., TAKAHASHI R., KUSAKA H., KAWAKAMI K. 2011. Protein disulfide isomerase immunopositive inclusions in patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Amyotrophic Lateral Sclerosis*; 12:444-450.
- IMOUNAN F., BOUSLAM N., AASFARAL J., EL-ALAOUIL K., REGRAGUIL W., BENCHADDOL E.A., BOUHOUCHEL A., BENOMARL A., YAHYAOUIL M. 2012. Vitamin E in ataxia and neurodegenerative diseases: a review. *World Journal of Neuroscience.*; 2:217-222.
- JOHNSTON P.E.J. 1998. Chronic degenerative myelopathy: a study of the pathology and pathogenesis. University of Glasgow. pp.1-237. PhD.
- JOHNSTON P.E.J., BARRIE J.A., MCCULLOCH M.C., ANDERSON T.J., GRIFFITHS I.R. 2000. Central nervous system pathology in 25 dogs with chronic degenerative radiculomyelopathy. *Vet. Rec.*; 146:629-33.
- JOHNSTON P.E.J., KNOX K., GETTINBY G., GRIFFITHS I.R. 2001. Serum alpha-tocopherol concentrations in German shepherd dogs with chronic degenerative radiculomyelopathy. *Vet. Rec.*; 148:403-407.
- JONES J.C., INZANA K.D., ROSSMEISL J.H., BERGMAN R.L., WELLS T., BUTLER K. 2005. CT myelography of the thoracolumbar spine in 8 dogs with degenerative myelopathy. *J. Vet. Sci.*; 6:341-8.
- KAMISHINA H., OJI T., CHEESEMAN J.A., CLEMMONS R.L. 2008. Detection of oligoclonal bands in cerebrospinal fluid from German shepherd dogs with degenerative myelopathy by isoelectric focusing and immunofixation. *Vet. Clin. Pathol.*; 37:217-20.
- KATHMANN I., CIZINAUSKAS S., DOERR M. G., STEFFEN F., JAGGY A. 2006. Daily controlled physiotherapy increases survival time in dogs with suspected degenerative myelopathy. *J. Vet. Intern. Med.*; 20:927–932.

- KHORIS J., MOULARD B., BRIOLOTTI V., HAYER M., DURIEUX A., CLAVELOU P., MALAFOSSE A., ROULEAU G.A., CAMU W. 2000. Coexistence of dominant and recessive familial amyotrophic lateral sclerosis with the D90A Cu,Zn superoxide dismutase mutation within the same country. *Eur. J. Neurol.*; 7:207–211.
- LOBSIGER C.S., BOILLÉE S., MCALONIS-DOWNES M., KHAN A.M., FELTRI M.L., YAMANAKA K., CLEVELAND D.W. 2009. Schwann cells expressing dismutase active mutant SOD1 unexpectedly slow disease progression in ALS mice. *Proceeding of the National Academy of Sciences.* 106:4465-4470.
- LONG S.N., HENTHORN P.S., SERPELL J. 2009. Degenerative myelopathy in Chesapeake Bay retrievers. *J. Vet. Intern. Med.*; 23:401-402 (Abstract).
- LONG S., CHANG R., WALKER A.K., ORIAN J., ATKIN J. 2012. Protein disulphide isomerase colocalisation with superoxide dismutase 1 in canine degenerative myelopathy: evidence for endoplasmic reticulum stress. *American College of Veterinary Internal Medicine (ACVIM) Forum.* 419 (Abstract).
- LONGHOFER S.L., DUNCAN I.D., MES-SING A. 1990. A degenerative myelopathy in young German Shepherd dogs. *J. Small Anim. Pract.*; 31:199-203.
- LORENZ D.M., COATES J.R., KENT M. 2012. Pelvic limb paresis, paralysis or ataxia. En: *Handbook of veterinary neurology.* (5<sup>th</sup> ed.), pp130-132. Eds.: Lorenz D.M., Coates J.R., Kent M. Elsevier, St. Louis MO.
- MARCH P. A., COATES J. R., ABYAD R. J., WILLIAMS D. A., O'BRIEN D. P., OLBY N. J., KEATING J. H., OGLESBEE M. 2009. Degenerative myelopathy in 18 Pembroke Welsh Corgi dogs. *Vet. Pathol.*; 46:41-250.
- MESFIN G.M., KUSEWITT D., PARKER A. 1980. Degenerative myelopathy in a cat. *J.A.V.M.A.*; 176:62-64.
- MATTHEWS N.S., DE LAHUNTA A. 1985. Degenerative myelopathy in an adult miniature poodle. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*; 186(11):1213-5.
- MILLER A.D., BARBER R., PORTER B.F., PETERS R.M., KENT M., PLATT S.R., SCHATZBERG S.J. 2009. Degenerative myelopathy in two Boxer dogs. *Vet. Pathol.*; 46:684-687.
- MORGAN J.P. 1969. Spinal dural ossification in the dog: incidence and distribution based on a radiographic study. *J. Am. Vet. Radiol. Soc.*; 10:43-48.
- MONTUSCHI P., BARNES P.J., ROBERTS L.J. 2004. Isoprostanes: markers and mediators of oxidative stress. *J. Fed. Am. Soc. Experim. Biol.*; 18:1791-1800.
- MORGAN B.R., COATES J.R., JOHNSON G.C., BUJNAK A.C., KATZ M.L. 2013. Characterization of intercostal muscle pathology in canine degenerative myelopathy: A disease model for Amyotrophic Lateral Sclerosis. *J. Neurosc. Res.* Published online 00 Month 2013 in Wiley Online Library (wileyonlinelibrary.com). DOI: 10.1002/jnr.23287.
- NAGAI M., AOKI M., MIYOSHI I., KATO M., PASINELLI P., KASAI N., BROWN R.H. JR, ITOYAMA Y. 2001. Rats expressing human cytosolic copper-zinc superoxide dismutase transgenes with amyotrophic lateral sclerosis: associated mutations develop motor neuron disease. *J. Neurosc.*; 21:9246-9254.
- NAYAK M.S., KIM Y.S., GOLDMAN M., KEIRSTEAD H.S., KERR D.A. 2006. Cellular therapies in motor neuron diseases. *Biochim. Biophys. Acta*; 1762 (11-12):1128-38.
- OGAWA M., UCHIDA K., PARK E. S., KAMISHINA H., SASAKI J., CHANG H.S., YAMATO O., NAKAYAMA H. 2011. Immunohistochemical observation of canine degenerative myelopathy in two Pembroke Welsh Corgi dogs. *J. Vet. Med. Sci.*; 73:1275–1279.

- OGAWA M., UCHIDA K., YAMATO O., INABA M., UDDIN M.M., NAKAYAMA H. 2014. Neuronal loss and decreased GLT-1 expression observed in the spinal cord of Pembroke Welsh Corgi dogs with canine degenerative myelopathy. *Vet. Pathol.* 51:591-602.
- OJI T., KAMISHINA H., CHEESEMAN J.A., CLEMMONS R.L. 2007. Measurement of myelin basic protein in the cerebrospinal fluid of dogs with degenerative myelopathy. *Vet. Clin. Pathol.*; 36:281-4.
- OUAHCHI K., ARITA M., KAYDEN H., HENTATI F., BEN H.M., SOKOL R., ARAI H., INOUE K., MANDEL J.L., KOENIG M. 1995. Ataxia with isolated vitamin E deficiency is caused by mutations in the alpha-tocopherol transfer protein. *Nature Genetics*; 9:141-145.
- PASINELLI P., BROWN R.H. 2006. Molecular biology of amyotrophic lateral sclerosis: insights from genetics. *Nat. Rev. Neurosc.*; 7:710-723.
- POLIZOPOLOU Z.S., KOUTINAS A.F., PATSIKAS M.N., SOUBASIS N. 2008. Evaluation of a proposed therapeutic protocol in 12 dogs with tentative degenerative myelopathy. *Acta Veterinaria Hungarica*; 56:1588-2705.
- ROBBERECHT W., VAN DEN BOSCH L., VLEMINCKX V. 2000. Amyotrophic lateral sclerosis: pathogenesis. *Acta Neurologica Belgica*. 100:181-187.
- ROMATOWSKI J. 1984. Degenerative myelopathy in a German shepherd. *Mod. Vet. Pract.*; 65:535-537.
- ROTHSTEIN J.D. 2009. Current hypotheses for the underlying biology of amyotrophic lateral sclerosis. *Ann. Neurol.*; 65 Suppl 1, S3-S9.
- RUAX C.G., COATES J.R., MARCH P.A., WILLIAMS D.A. 2003. Analysis of oligoclonal banding in CSF and serum from dogs with degenerative myelopathy. *J. Vet. Intern. Med.*; 17:401.
- SANDELIN E., NORDLUND A., ANDERSEN P.M., MARKLUND S.S., OLIVEBERG M. 2007. Amyotrophic lateral sclerosis-associated copper/zinc superoxide dismutase mutations preferentially reduce the repulsive charge of the proteins. *J. Biol. Chem.*; 282:21230–21236.
- SHAFIE I.N.F. 2013. The establishment of potential cerebrospinal fluid biomarkers for canine degenerative myelopathy. University of Glasgow. pp. 24-78. PhD.
- SHAW P.J., EGGETT C.J. 2000. Molecular factors underlying selective vulnerability of motor neurons to neurodegeneration in amyotrophic lateral sclerosis. *J. Neurol.*; 247 Suppl 1:I17-I27.
- SHEFNER J.M., CUDKOWICZ M.E., ZHANG H., SCHOENFELD D., JILLAPALLI D. 2007. Revised statistical motor unit number estimation in the Celecoxib/ALS trial. *Muscle Nerve*. 35:228-234.
- SHELTON G.D., JOHNSON G.C., O'BRIEN D.P., KATZ M.L., PESAYCO J.P., CHANG B.J., MIZISIN A.P., COATES J.R. 2012. Degenerative myelopathy associated with a missense mutation in the superoxide dismutase 1 (SOD1) gene progresses to peripheral neuropathy in Pembroke Welsh corgis and boxers. *J. Neurol. Sci.*; 318:55–64.
- SMITH R.A., MILLER T.M., YAMANAKA K. MONIA B.P., CONDON T.P., HUNG G., LOBSIGER C.S., WARD C.M., MCALONIS-DOWNES M., WEI H., WANCEWICZ E.V., BENNETT C.F., CLEVELAND D.W. 2006. Antisense oligonucleotide therapy for neurodegenerative disease. *J. Clin. Invest.*; 116(8):2290-6.
- SONG J.H., HUANG C.S., NAGATA K., YEH J.Z., NARAHASHI T. 1997. Differential action of riluzole on tetrodotoxin-sensitive and tetrodotoxin-resistant sodium channels. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*; 282 (2): pp. 707–14
- TURNER B.J., TALBOT K. 2008. Transgenics, toxicity and therapeutics in rodent models

- of mutant *SOD1*-mediated familial ALS. *Progress in Neurobiol.*; 85:94-134.
- URUSHITANI M., EZZI S.A., JULIEN J.P. 2007. Therapeutic effects of immunization with mutant superoxide dismutase in mice models of amyotrophic lateral sclerosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 104(7):2495-500.
- VAN DAMME P., ROBBERECHT W. 2009. Recent advances in motor neuron disease. *Curr. Opin. Neurol.*; 22:486-92.
- VASQUEZ L. 2011. Development of a motor unit number establishment estimation technique in normal dogs: a potential biomarker for canine degenerative myelopathy. University of Missouri-Columbia. pp 1-94. Master of Science.
- WAXMAN F.J., CLEMMONS R.M., HINRICHS D.J. 1980a. Progressive myelopathy in older German shepherd dogs. II. Presence of circulating suppressor cells. *J. Immun.*; 124:1216-1222.
- WAXMAN F.J., CLEMMONS R.M., JOHNSON G., EVERMANN J.F., JOHNSON M.I., ROBERTS C., HINRICHS D.J. 1980b. Progressive myelopathy in older German shepherd dogs. I. Depressed response to thymus-dependent mitogens. *J. Immun.*; 124:1209-1215.
- WILLIAMS D.A., BATT R.M., SHARP N.J.H. 1984. Degenerative myelopathy in German Shepherd dogs: an association with mucosal biochemical changes and bacterial overgrowth in the small intestine. *Clinical Science.* 66, 25p (Abstract).
- WILLIAMS D.A., PRYMAK C., BAUGHAN J. 1985. Tocopherol (vitamin E) status in canine degenerative myelopathy. *Proceedings of 3rd Annual American College of Veterinary Internal Medicine, Veterinary Medicine Forum.* (Abstract).
- WININGER F.A., ZENG R., JOHNSON G. S., KATZ M. L., JOHNSON G. C., BUSH W. W., JARBOE J. M., COATES J. R. 2011. Degenerative myelopathy in a Bernese Mountain Dog with a novel *SOD1* missense mutation. *J. Vet. Intern. Med.*; 25:1166-1170.
- ZENG R. 2013. Molecular genetic studies in canine inherited diseases including neonatal cerebellar ataxia, degenerative myelopathy and multiple system degeneration. A dissertation presented to the Faculty of the Graduate School, University of Missouri.