
REZUMAT AL TEZEI DE DOCTORAT

Cercetări privind afecțiunile neurologice ereditare la câine și tehnici de genetică moleculară utilizate pentru diagnosticul mielopatiei degenerative canine

Doctorand **Vlad Cocosîrc**

Conducător de doctorat **Prof. univ. dr. Dana Liana Pusta**



I. Introducere

Conform bazei de date OMIA (Online Mendelian Inheritance in Animals), există 418 afecțiuni cu transmitere mendeliană la câine, din care la 355 a fost identificată până în prezent mutația genei responsabile (Nicholas & Tammen, 1995). Studiile genomice oferă informații privind caracterele ereditare ale bolilor și posibilitatea dezvoltării și identificării unor markeri pentru diagnosticul indivizilor purtători și, ulterior, intervenirea prin împerecherea selectivă a acestora pentru prevenirea emergenței acestor afecțiuni (Shearin & Ostrander, 2010). De asemenea, există multiple afecțiuni la câini care pot servi ca model genetic pentru viitoarele cercetări privind afecțiunile omului și, implicit, descrierea mutației genomice la om și câine (Shaffer, 2019).

Un număr mare de afecțiuni neurologice ereditare au fost documentate la câini. Aceste afecțiuni includ tulburări congenitale, neonatale, cu debut tardiv, precum și forme progresive și non-progresive. Astfel, este posibil ca orice câine cu simptome neurologice să aibă o afecțiune ereditară subiacentă. În cazurile în care mutația urmează un model recesiv, animalele clinic afectate se nasc doar atunci când există consangvinizări, ceea ce duce la moștenirea a două copii identice ale mutației, una de la fiecare părinte, care sunt sănătoși, dar purtători ai genei, fiind heterozigoți. Prin urmare, anumite boli ereditare sunt în general asociate cu unele rase sau cu rase strâns înrudite, datorită bagajului genetic comun (Mellersh, 2014).

Mielopatia degenerativă canină (MDC) este cunoscută de aproape 50 de ani ca fiind o boală care se manifestă la câinii adulți și se caracterizează prin procese neurodegenerative ale măduvei spinării. Boala se manifestă prin deteriorarea progresivă a funcțiilor motorii. Afecțiunea a fost descrisă prima dată la rasa Ciobănesc German în anul 1973 (Averill, 1973). Mutația responsabilă de apariția afecțiunii a fost identificată în anul 2009 (Awano et al., 2009), ca fiind o tranziție de la G la A (c.118G>A) în exonul 2 al genei SOD1 (superoxide dismutase 1).

Având în vedere că majoritatea mutațiilor au frecvențe scăzute, poate fi dificil pentru orice medic veterinar să identifice și să aibă competențe în diagnosticarea gamei largi de tulburări ereditare. Acest lucru subliniază importanța formării medicale continue și prezența specialiștilor veterinari cu expertiză specifică în consilierea genetică. Se pune accentul, de asemenea, pe importanța tehnicilor cuprinzătoare de screening și de diagnostic al acestor ereditari.

Ipoteza de lucru

În cadrul studiului bibliografic, primul capitol a urmărit să identifice tehnicile de genetică moleculară utilizate în diagnosticul bolilor genetice cu transmitere

mendeliană la câine pentru a explora necesarul tehnic și logistic. În continuare, este prezentată o sinteză a afecțiunilor neurologice ereditare cu transmitere mendeliană și mutație causală cunoscută, pentru a observa aplicabilitatea acestor tehnici. Dintre aceste afecțiuni, s-a remarcat mielopatia degenerativă canină, care momentan este cea mai bine documentată afecțiune ereditară a sistemului nervos la câine, astfel încât această afecțiune a fost descrisă în detaliu.

Prima parte a cercetărilor proprii a urmărit să facă o clasificare în sistemul ABC modificat a afecțiunilor neurologice ereditare cu transmitere mendeliană pentru a identifica semnificația patologică și genetică a acestora.

A doua parte a cercetărilor proprii a urmărit identificarea bolilor cu determinism genetic înregistrate în cadrul Disciplinei de Morfopatologie și Diagnostic Necropsic FMV Cluj-Napoca pe o perioadă de 10 ani.

Cercetările din ultima parte a tezei sunt dedicate mielopatiei degenerative canine. În ceea ce privește MDC, s-a urmărit stabilirea și validarea unui protocol de lucru eficient pentru tehnica PCR, prin testarea a două protocoale de lucru diferite pentru identificarea genei *SOD1*, și apoi identificarea mutațiilor posibile prin tehnica RFLP. În continuare, s-a urmărit testarea la scară extinsă a câinilor de rasă din România pentru a se estima prevalența MDC și validarea tehnicilor PCR-RFLP prin secvențiere Sanger.

Obiective

1. Analiza afecțiunilor neurologice ereditare cu transmitere mendeliană și mutație causală cunoscută și caracterizarea acestora în funcție de nivelul de documentare al mutațiilor;
2. Efectuarea unui studiu retrospectiv pentru a identifica afecțiunile genetice diagnosticate necropsic la câini, în cadrul Disciplinei de Morfopatologie și Diagnostic Necropsic din cadrul FMV Cluj-Napoca pe o perioadă de 10 ani;
3. Testarea diferitelor protocoale de lucru pentru tehnici de genetică moleculară aplicate în diagnosticul mielopatiei degenerative (PCR-RFLP);
4. Supravegherea moleculară a prevalenței mutației *SOD1:c.118G>A* asociate mielopatiei degenerative la câinii de rasă din România.
5. Validarea protocoalelor PCR-RFLP prin secvențiere Sanger;
6. Prezentarea unor studii de caz pentru a evidenția importanța testului genetic pentru MDC în context clinic.

II. CONTRIBUȚIA PERSONALĂ

1. Analiza afecțiunilor neurologice ereditare cu transmitere mendeliană și mutație cauzală cunoscută, și caracterizarea acestora în funcție de nivelul de documentare al mutațiilor

Scopul cercetării de față a fost de a identifica modele repetitive în cadrul afecțiunilor neurologice cu transmitere mendeliană descrise în literatura de specialitate și sintetizate în studiul bibliografic și clasificarea acestor afecțiuni în funcție de nivelul documentării.

Obiectivele urmărite au fost:

- Identificarea raselor de câini cu predispoziție pentru dezvoltarea de afecțiuni neurologice cu transmitere mendeliană;
- Identificarea frecvenței tipurilor de mutații implicate în afecțiunile neurologice cu transmitere mendeliană;
- Caracterizarea nivelului documentării afecțiunilor neurologice cu transmitere mendeliană pe baza evaluării funcționale și clinice în sistemul de clasificare ABC modificat, folosit în prezent pentru clasificarea mutațiilor specifice omului.

Concluzii:

Rasele de câini mai predispuse la dezvoltarea unor astfel de boli sunt Golden Retriever, la care au fost documentate 6 tulburări neurologice ereditare cu mutație cauzală cunoscută și Ciobănescul Belgian, la care au fost documentate 5 tulburări neurologice ereditare cu mutație cauzală cunoscută.

Cea mai documentată și răspândită afecțiune neurologică ereditară este mielopatia degenerativă canină, fiind documentată la peste 120 de rase de câini.

Cele mai frecvente tipuri de mutații pentru tulburările neurologice ereditare la câini sunt mutațiile de tip misens ($n = 46$, 41%) și delețiile reduse ($n = 21$, 19%), conform Fig. 1.

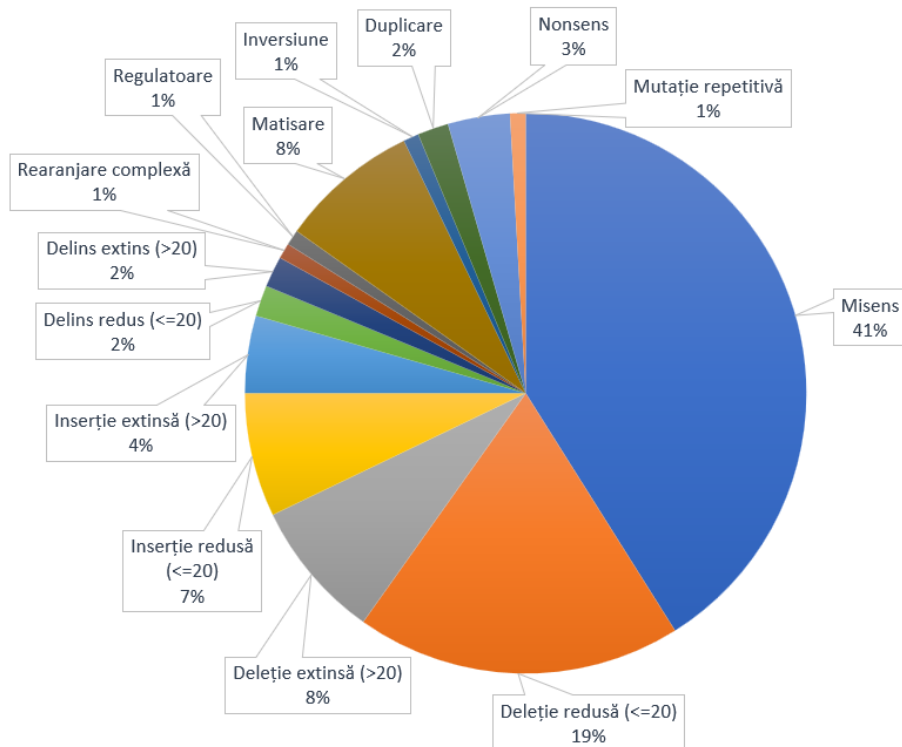


Fig. 1 - Distribuția tipurilor de mutații specifice bolilor neurologice ereditare cu mutații cunoscute

Evaluarea în sistemul ABC a identificat că 16 dintre mutații au fost clasificate ca fiind mutații patogene, iar restul de 96 au fost clasificate ca fiind mutații probabil patogene.

2. Studiu retrospectiv privind bolile genetice identificate prin examen necropsic la câini

Scopul cercetării de față a fost abordarea din punct de vedere practic a cazuisticii genetice, prin identificarea bolilor genetice diagnosticate necropsic la câini pe baza studiului registrelor de cazuri înregistrate în cadrul Disciplinei de Morfopatologie și Diagnostic Necropsic din cadrul Facultății de Medicină Veterinară Cluj-Napoca.

Obiectivele urmărite au fost:

- Analiza registrelor Disciplinei de Morfopatologie și Diagnostic Necropsic pe o perioadă de 10 ani (ianuarie 2012 – ianuarie 2022);
- Identificarea cazurilor cu diagnostice care ar putea avea o etiologie genetică și încadrarea lor în funcție de sistemele anatomiche implicate.

Concluzii:

Au fost identificați 206 câini cu cel puțin o afecțiune care a putut fi incriminată ca fiind genetică. Din studiu, au fost excluse cazurile cu afecțiuni de natură tumorală, afecțiuni de natură infecțioasă, parazitară, inflamatorie, traumatisme, intoxicații, probele de țesuturi, biopsiile, aspiratele citologice și cazurile destinate exclusiv incinerării.

Din cadrul afecțiunilor genetice ale sistemului digestiv au fost identificate 73 de cazuri având următoarele patologii: dilatație-torsiune gastrică (n = 62), megaesofag (n = 4), palatoschisis (n = 3), hernie transdiafragmatică (n = 2), cheilopalatoschisis (n = 1) și stenoza intestinală (n = 1).

În categoria afecțiunilor genetice ale sistemului cardiovascular au fost identificate 115 de cazuri cu următoarele patologii: cardiomiopatie dilatativă (n = 63), cardiomiopatie hipertrofică (n = 35), stenoză subvalvulară aortică (n = 4), stenoză valvulară aortică (n = 3), defect de sept interatrial (n = 2), defect de sept interventricular (n = 2), persistența ductului arterial (n = 2), displazie de valvă mitrală, stenoza trunchiului arterial pulmonar (n = 2), dextropozitia aortei (n = 1), și prezența concomitentă a canalului atrial, defectului de sept ventricular și defectului de sept atrial (n = 1).

În categoria afecțiunilor genetice ale sistemului nervos au fost identificate 10 cazuri de hidrocefalie internă.

În ceea ce privește afecțiunile sistemului locomotor, au fost identificate 5 cazuri de displazie coxofemurală.

Din categoria afecțiunilor genetice genito-urinare, au fost identificate 8 cazuri de pacienți cu testicul criptorhid și 3 cazuri de displazie renală.

Se recomandă implicarea medicilor veterinari în informarea și conștientizarea proprietarilor asupra originii genetice a bolilor identificate în prezentul studiu, aplicarea măsurilor de profilaxie genetică și efectuarea testelor de genetică moleculară cu scop de screening sau pentru stabilirea diagnosticului diferențial.

3. Testarea comparativă a tehnicilor de genetică moleculară aplicate în diagnosticul mielopatiei degenerative canine

Studiul de față a avut drept scop realizarea unor cercetări preliminare pentru identificarea metodelor și tehnicilor de genetică moleculară aplicate pentru diagnosticul mielopatiei degenerative canine.

Principalele obiective ale prezentului studiu au fost optimizarea protocolului PCR, respectiv RFLP pentru identificarea mutației *C.118G>A* a genei *SOD1*, precum și identificarea mutației *C.118G>A* a genei *SOD1* prin tehnica PCR-RFLP la rasa Ciobănesc Carpatin.

Concluzii:

Prezentul studiu este primul care vizează monitorizarea moleculară a mutației *c.118G>A* al genei *SOD1*, asociată mielopatiei degenerative canine la rasa Ciobănesc Carpatin. Tehnica PCR-RFLP a fost sensibilă și specifică, dovedindu-se a fi utilă în acest sens. Datorită ampliconilor mai evidenți rezultați în urma aplicării protocolului 2 de incubare (adaptat conform Holder și colab., 2014), s-a decis folosirea acestuia pentru testarea celor 19 probe. De asemenea, datorită rezultatelor obținute am optat pentru utilizarea polimerazei MyTaq Red pentru testarea probelor. Rezultatele au indicat că indivizii testați aparținând rasei Ciobănesc Carpatin au fost homozigoți cu alele normale (G/G), nefiind identificată alela mutantă A.

4. Supravegherea moleculară a prevalenței mutației *SOD1:c.118G>A* asociate mielopatiei degenerative la câinii de rasă din România

Scopul prezentului studiu este de a estima prevalența mutației *SOD1:c.118G>A* caracteristică mielopatiei degenerative la câinii de rasă din România.

Pentru realizarea scopului propus, cercetarea de față are următoarele obiective:

- Recoltarea probelor de tampon bucal de la câinii de rasă (atestați prin pedigree);
- Prelucrarea probelor recoltate prin PCR-RFLP;
- Clasificarea indivizilor în funcție de genotip, pe baza rezultatelor obținute;
- Estimarea prevalenței alelei mutante la câinii de rasă;
- Evidențierea importanței supravegherii mutației asociate MDC în context clinic și chinologic;
- Compararea rezultatelor obținute cu cele din literatura de specialitate;
- Elaborarea de recomandări pentru clinicieni și crescătorii de câini.

Concluzii:

Prezentul studiu oferă date importante legate de apariția mutației *SOD1:c.118G>A* în 28 de canise din România. Conform cunoștințelor noastre, acest studiu raportează primul screening al câinilor din rasele Ciobănesc de Bucovina, Ciobănesc Caucazian și Ciobănesc Mioritic pentru MDC.

Rata de succes a izolării ADN-ului și amplificării (PCR-RFLP) a fost de 100%, demonstrând că tampoanele orale reprezintă surse bune pentru testarea genetică a MDC. Genotipurile G/G, A/G și A/A pot fi observate în Fig. 2, în cadrul căreia sunt prezentate rezultatele obținute în urma efectuării PCR-RFLP.

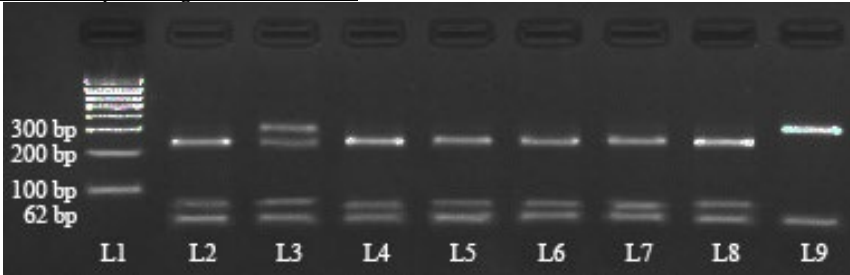


Fig. 2. Rezultatele migrării în gel de agar în urma efectuării PCR-RFLP.

Legendă: L1 - scara ADN de 100 pb. Probele L2, L4, L5, L6, L7, L8 corespund genotipului G/G (230pb și 62pb); Proba L3 corespunde genotipului A/G (292pb, 230pb, and 62pb); Proba L9 corespunde genotipului AA (292bp).

Din cei 230 de câini testați, 204 au fost homozigoți sănătoși (G/G), 16 au fost heterozigoți (A/G), iar 10 au fost homozigoți pentru alela mutantă (A/A). Alela mutantă (A) a fost identificată la 6 din cele 26 de rase testate. Frecvența alelei mutante (A) asociată cu MDC pentru cele 230 de probe a fost de 0,0783. Segregarea rezultatelor pe rase a indicat o frecvență de 1 la Wire Fox Terrier, 0,2500 la Ciobănescul Mioritic, 0,2000 la Ciobănescul German, 0,0833 la Rottweileri și 0,0313 la Ciobănescul Belgian. Mutația *SOD1:c118G>A* a fost identificată pentru prima dată la Ciobănescul Mioritic. Cu toate acestea, mutația nu a fost identificată la exemplarele din rasele Ciobănesc de Bucovina și Ciobănesc Caucazian luate în acest studiu.

5. Validarea genotipării prin secvențiere de tip Sanger

Scopul acestui studiu a fost validarea rezultatelor prezentate în Capitolele 8 și 9 prin compararea electroforegramelor cu secvența de referință pentru gena canină SOD1.

Obiective urmărite au fost următoarele:

- Amplificarea, purificarea și secvențierea de tip Sanger a câte două probe corespunzând fiecărui genotip (G/G, A/G, A/A) specific MDC;
- Analiza calității, vizualizarea și prelucrarea secvențelor rezultate folosind programul Geneious 4.8.5.

Concluzii:

Secvențierea celor șase probe de ADN provenite de la câini cu toate cele trei variante de genotip G/G, A/G și A/A și analiza electroforegramelor obținute a confirmat rezultatele obținute prin tehnica PCR-RFLP, conform Fig. 3.

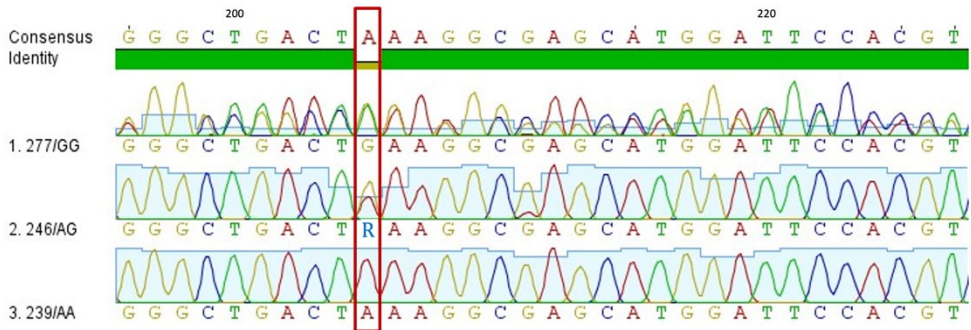


Fig. 3. Electropherogramele genei *SOD1* din regiunea exonului 2 care găzduiește mutația *c.118G > A* asociată cu MDC

Legendă: Dreptunghiul roșu evidențiază poziția SNP-ului. Proba 1. 277/GG aparține unui câine cu genotipul homozigot G/G; Proba 2. 246/AG aparține unui câine cu genotipul heterozigot A/G. Proba 3. 239/AA aparține unui câine cu genotipul homozigot A/A.

6. Studii de caz

În cadrul acestui capitol a fost realizată o sinteză a cazurilor întâlnite în clinică, în vederea evidențierii importanței efectuării testului genetic pentru MDC în contextul clinic. Cele 5 tipologii de cazuri selectate pentru a fi prezentate au fost: caz homozigot G/G fără semne clinice testat în scopul screeningului, caz homozigot G/G cu semne clinice în vederea stabilirii diagnosticului diferențial, caz heterozigot A/G în vederea stabilirii diagnosticului diferențial, caz homozigot A/A cu semne clinice și caz homozigot A/A cu semne clinice, având un posibil genotip homozigot recesiv cu penetranță incompletă.

III. Concluzii finale și recomandări

Scopul cercetării de față a fost realizarea unui studiu bibliografic exhaustiv al bolilor neurologice cu mutație cunoscută la câine și caracterizarea acestora în funcție de nivelul de documentare al mutațiilor, efectuarea unui studiu retrospectiv pentru a identifica afecțiunile genetice diagnosticate necropsic la câini, studiul tehnicilor de genetică moleculară utilizate în diagnosticul mielopatiei degenerative canine și estimarea prevalenței mutației asociate mielopatiei degenerative la câinii de rasă din România.

Având în vedere prevalența bolilor neurologice autozomal recesive, sunt necesare consilierea genetică și programe de reproducere pentru a reduce incidența acestor tulburări la rasele predispuse, cum ar fi Golden Retriever și Ciobănescul Belgian.

Documentarea extensivă a mielopatiei degenerative canine evidențiază importanța eforturilor continue de cercetare și documentare pentru o mai bună

Cercetări privind prevalența bolilor genetice la câine și tehnici de genetică moleculară utilizate pentru diagnosticul mielopatiei degenerative canine înțelegere și gestionare a bolilor neurologice ereditare la diverse rase.

Validarea tehnicii PCR-RFLP ca fiind specifică, rapidă și eficientă sugerează potențialul său pentru utilizarea largă în diagnosticarea genetică, în special pentru detectarea mielopatiei degenerative canine. Confirmarea rezultatelor PCR-RFLP prin secvențiere Sanger consolidează fiabilitatea acestei metode de diagnostic, susținând adoptarea sa în testarea genetică de rutină pentru această ereditate.

Detecția mutației *SOD1:c.118G>A* la Ciobănescul Mioritic Românesc, pentru prima dată, evidențiază necesitatea supravegherii genetice continue și continuarea cercetărilor la rasele mai puțin studiate pentru a asigura strategii cuprinzătoare de diagnostic și prevenire a afecțiunilor genetice.

Recomandări

Cunoașterea genotipului unui animal tânăr cu o mutație cunoscută poate fi benefică pentru viitoarele decizii clinice. Având în vedere că MDC este o tulburare autozomal recesivă cu penetranță incompletă, se recomandă utilizarea testării genetice care este importantă pentru profilaxia genetică în vederea evitării apariției indivizilor homozigoți pentru alela mutantă *SOD1:c.118G>A*, deoarece aceștia vor prezenta un risc foarte mare de a dezvolta MDC. Folosirea testelor genetice este importantă și pentru îmbunătățirea programelor de montă la rasele cunoscute ca fiind predispuse la mielopatie degenerativă canină. Este de remarcat că în cazul rasei Wire Fox Terrier acest test genetic pentru MDC nu are valoare pentru diagnostic sau selectarea indivizilor pentru montă, având în vedere prezența alelei mutante la indivizii sănătoși.

Testarea genetică are, de asemenea, utilitate în diagnosticul diferențial al MDC și a unor patologii neurologice similare, cum ar fi: sindromul lombosacral degenerativ, neoplazii ale măduvei spinării, boala discului intervertebral, ruptura ligamentului cruciat cranian și displazia de șold.

Testarea genetică poate juca un rol vital în gestionarea eficientă și în cele din urmă eradicarea bolilor moștenite. Bolile recesive reprezintă o provocare deosebită pentru crescătorii de câini deoarece genitorii sunt adesea purtători asimptomatici în populație, care pot fi identificați numai retrospectiv, de obicei după ce au dat deja naștere descendenților afectați sau, în unele cazuri, după ce unul dintre părinți a fost diagnosticat cu boala. Această provocare este și mai complicată atunci când se tratează tulburări cu debut tardiv, în cazul cărora câinii afectați pot fi utilizați la montă fără să știe că au o afecțiune genetică. Această problemă este prezentă atât în cazul bolilor cu determinism genetic autosomal dominant, cât și în cazul celor determinate autosomal recesiv.

Având în vedere că majoritatea mutațiilor au frecvențe scăzute, poate fi dificil pentru orice medic veterinar să identifice și să aibă competențe în diagnosticarea gamei largi de tulburări ereditare. Acest lucru subliniază importanța formării medicale

continue și prezența specialiștilor veterinari cu expertiză specifică în consilierea genetică. Se pune accentul, de asemenea, pe importanța metodelor de screening.

IV. Originalitatea și contribuțiile inovative ale tezei

Secțiunea de prezentare a stadiului actual al cunoașterii aferent acestei lucrări a avut ca și scop prezentarea tehnicilor de genetică moleculară utilizate în diagnosticarea afecțiunilor genetice cu transmitere mendeliană la câini și realizarea unui studiu original de sistematizare a 112 fenotipuri patologice cu mutație cauzală cunoscută ale sistemului nervos canin, prin adaptarea sistemului de clasificare ABC utilizat în medicina umană. Studiul afecțiunilor neurologice ereditare cu mutație cauzală cunoscută a relevat faptul că majoritatea acestor boli au mod de transmitere autozomal recesiv, iar rasele de câini mai predispuse la dezvoltarea acestor afecțiuni sunt Golden Retriever (6 fenotipuri documentate) și Ciobănescul Belgian (5 fenotipuri documentate). De asemenea, cele mai frecvente tipuri de mutații pentru tulburările neurologice ereditare la câini sunt mutațiile de tip misens ($n = 46$, 41%) și delețiile reduse ($n = 21$, 19%). Evaluarea originală în sistemul ABC, prezentată pentru prima dată în lucrarea de față, a dezvăluit că 16 dintre mutații au fost clasificate ca fiind mutații patogenice, iar restul de 96 au fost clasificate ca fiind mutații probabil patogenice. Conform cunoștințelor noastre, aceasta este prima clasificare de acest tip făcută mutațiilor asociate afecțiunilor ereditare ale sistemului nervos la câini. În plus, coroborarea datelor bibliografice oferă noi oportunități de cercetare a afecțiunilor genetice ale sistemului nervos la rasele de câini în cadrul cărora acestea nu au fost încă documentate.

Testarea tehnicilor de genetică moleculară aplicate în diagnosticul mielopatiei degenerative a avut ca și scop stabilirea și validarea unui protocol facil în acest sens. Rezultatele au indicat că probele de tampon bucal recoltate prin metode minim invazive de la câini sunt o sursă adecvată de ADN în vederea testării pentru mielopatie degenerativă canină. De asemenea, dintre cele două protocoale de incubare testate, protocolul adaptat conform lucrării lui Holder și colab. (2014) s-a dovedit a fi mai eficient datorită ampliconilor mai evidenți vizualizați în urma migrării prin electroforeză în gel de agaroză. În plus, în cadrul acest capitol a fost documentată prima testare a câinilor aparținând rasei Ciobănesc Carpatin. Cei 19 indivizi testați au fost homozigoți cu alele normale (G/G), nefiind identificată alela mutantă A.

În cadrul capitolului dedicat supravegherii moleculare a mutației *SOD1:c118G>A* asociate mielopatiei degenerative canine din România, au fost testați 230 de câini aparținând la 26 de rase. Conform cunoștințelor noastre, acest studiu raportează prima testare pentru mielopatie degenerativă a câinilor din rasele Ciobănesc de Bucovina, Ciobănesc Caucazian și Ciobănesc Mioritic. Mutația *SOD1:c118G>A* a fost identificată pentru prima dată la rasa Ciobănesc Mioritic, însă nu și la rasele Ciobănesc de Bucovina și Ciobănesc Caucazian. De asemenea, studiul

Cercetări privind prevalența bolilor genetice la câine și tehnici de genetică moleculară utilizate pentru diagnosticul mielopatiei degenerative canine reprezintă prima documentare și cercetare a supravegherii mutației asociate mielopatiei degenerative canine în România.

Secvențierea celor șase probe de ADN provenite de la câini cu toate cele trei variante de genotip G/G, A/G și A/A specifice MDC și analiza electroforegramelor obținute a confirmat rezultatele obținute prin tehnica PCR-RFLP.

Rezultatele prezentate pot servi ca sursă de informare pentru creșterea gradului de conștientizare asupra prezenței acestor tipuri de afecțiuni, importanța recunoașterii lor și implementarea măsurilor de profilaxie genetică în vederea scăderii prevalenței acestora.

Bibliografie

1. 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), 1045–1051.
2. 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. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(8), 2794–2799. <https://doi.org/10.1073/pnas.0812297106>
3. Holder, A. L., Price, J. A., Adams, J. P., Volk, H. A., & Catchpole, B. (2014). A retrospective study of the prevalence of the canine degenerative myelopathy associated superoxide dismutase 1 mutation (SOD1:c.118G > A) in a referral population of German Shepherd dogs from the UK. *Canine Genetics and Epidemiology*, 1(1), 10. <https://doi.org/10.1186/2052-6687-1-10>
4. Mellersh, C. (2014). Inherited Neurologic Disorders in the Dog. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, 44(6), 1223–1234. <https://doi.org/10.1016/j.cvsm.2014.07.011>
5. Nicholas, F., & Tammen, I. (1995). *Online Mendelian Inheritance in Animals (OMIA)* [dataset]. University of Sydney. <https://doi.org/10.25910/2AMR-PV70>
6. Shaffer, L. G. (2019). Special issue on canine genetics: Animal models for human disease and gene therapies, new discoveries for canine inherited diseases, and standards and guidelines for clinical genetic testing for domestic dogs. *Human Genetics*, 138(5), 437–440. <https://doi.org/10.1007/s00439-019-02025-5>
7. Shearin, A. L., & Ostrander, E. A. (2010). Leading the way: Canine models of genomics and disease. *Disease Models & Mechanisms*, 3(1–2), 27–34. <https://doi.org/10.1242/dmm.004358>