

Primer diagnóstico molecular de abiotrofia cerebelar en un equino Árabe en Uruguay

First molecular diagnosis of cerebellar abiotrophy in an Arabian foal in Uruguay

Rosa Gagliardi¹, Laura De León², Cinthya Catania³, Cecilia Ghiringhelli³, Silvia Llambi¹

¹ Área Genética, Facultad de Veterinaria, Universidad de la República (UdelaR), Uruguay.

Correspondencia R. Gagliardi: rgagliar@gmail.com

² Dra. en Medicina y Tecnología Veterinaria, ejercicio libre de la profesión.

³ Tesistas de Grado, Facultad de Veterinaria, UdelaR

Veterinaria (Montevideo) Volumen 54
Nº 210 - 7 (2018) 43-45

DOI: 10.29155/VET.54.210.7

Recibido : 05/03/2018

Aceptado: 16/05/2018



Resumen

La abiotrofia cerebelar (AC) es una enfermedad neurodegenerativa causada por una mutación en el ADN que afecta a las células de Purkinje del cerebelo, produciendo principalmente problemas en el balance y la coordinación de los animales. Entre las especies que se ven afectadas se encuentra la equina, particularmente la raza Árabe. En este trabajo se presenta el caso de un potrillo árabe que presentó sintomatología compatible con AC. Los hallazgos clínicos se confirmaron mediante estudios moleculares y confirmación por histopatología de las lesiones. Los estudios moleculares permitieron confirmar la presencia de la mutación causal. Dados estos hallazgos y que la sintomatología neurológica compatible con la abiotrofia cerebelar en equinos no es nueva en nuestro país, se considera que sería importante estudiar a nivel poblacional la raza Árabe, con el fin de conocer la prevalencia y casuística de AC en Uruguay.

Palabras clave: Abiotrofia cerebelar en equinos, equinos árabe, enfermedad hereditaria.

Summary

Cerebellar abiotrophy (CA) is a neurodegenerative disease caused by a mutation in the DNA that affects the Purkinje cells of the cerebellum, mainly causing problems in the balance and coordination of animals. Among the species that are affected is equine, mainly the Arabian breed. In this study we presented the case of an Arabian foal with clinic signs compatible with the pathology mentioned before. Histopathological and molecular studies were carried out to confirm the clinical findings, giving results that were positive for CA in both cases. Considering these findings and that the neurological symptomatology compatible with CA in horses is not new in our country, it is important to study the Arabian breed at a population level, in order to know the prevalence of CA in Uruguay.

Key words: Equine cerebellar abiotrophy, Arabian horse, hereditary disease.

Introducción

La abiotrofia cerebelar (AC) se ha descrito en diferentes especies entre las que se encuentran caninos, ovinos, bovinos y equinos (Brault y col., 2011a). En equinos se presenta en caballos Árabes, y razas derivadas tales como Bashkir Curly, Trakehners y Welsh ponies. Se trata de una enfermedad neurodegenerativa causada por una mutación en el ADN que afecta a las células de Purkinje del cerebelo, produciendo principalmente problemas en el balance y la coordinación de los animales afectados. Los signos clínicos que se presentan son ataxia, movimientos exagerados en los miembros anteriores, temblores de la cabeza, falta de respuesta a la amenaza, búsqueda de mayor base de sustentación y caídas frecuentes al suelo y dificultad para incorporarse de posiciones de decúbito. Estos signos son consistentes con la pérdida de las neuronas de Purkinje y una desorganización de la estructura de las tres capas del cortex cerebeloso (Cavalleri y col., 2013; Sadaba y col., 2016; Scott y col., 2017; UC Davis, 2018). Tanto la gravedad de los signos mencionados como la edad de inicio de la enfermedad son variables, existiendo casos en los que no se presenten algunos signos o éstos sean muy leves, e incluso se han descrito casos de animales que teniendo la mutación responsable de la AC aparentan ser normales (Brault y col., 2011b). En cuanto al momento de la manifestación clínica, los potrillos neonatos pueden no mostrar sintomatología, pero al comenzar a degenerarse las células de Purkinje comenzarán a notarse los signos clínicos, situación que se puede dar desde los pocos días de nacido hasta alrededor de los seis meses de edad, siendo lo más usual entre las seis semanas y los cuatro meses de vida (Sadaba y col., 2016).

Los hallazgos patológicos incluyen degeneración de las neuronas de Purkinje y células asociadas del cerebelo que lleva a una desorganización de las capas granular y molecular del cerebelo. Las neuronas de Purkinje restantes están disminuidas de tamaño y presentan alteraciones en su morfología (Sadaba y col., 2016; UC Davis, 2018).

En las diferentes especies en las que se presenta la enfermedad se plantean diferentes etiologías. En equinos, en la raza Árabe hay predisposición a la AC. En estos animales se describió a nivel del ADN, en el cromosoma 2 (ECA2) una mutación puntual de tipo Polimorfismo de Nucleótido Simple (SNP) donde una G cambia por una A en el gen *TOEI*, que afecta la expresión del gen *MUTYH*. Esto implica que se trate de un problema hereditario, descrito en este caso como autosómico recesivo (Brault y col., 2011 a; b). Un animal normal presenta dos copias del alelo normal N, (genotipo N/N, homocigota) para el gen *TOEI*, un animal portador ambas copias son diferentes, una normal y otra con la mutación mencionada, AC (genotipo N/AC, heterocigota) y un animal con la patología va a presentar genotipo AC/AC, al ser una enfermedad recesiva, ambas copias alélicas tienen que ser iguales. Cuando se cruzan dos animales que son portadores de dicha mutación (heterocigotas N/AC) existe un 25% de probabilidad de que el potrillo nacido sea AC/

AC (homocigota para el alelo mutado) y desarrolle la patología (Brault y col., 2011a; b; Arabian Horse Association 2018). A nivel internacional existen laboratorios que brindan el servicio de diagnóstico molecular de la mutación AC.

Materiales y métodos

Caso clínico

El caso en estudio corresponde a un potrillo macho que presentó sintomatología nerviosa a los 40 días de edad. Según la anamnesis, al inicio se observó el temblor de fascias; los signos se fueron agravando en el correr de una semana. El examen general mostró mucosas, grandes funciones y deposiciones normales. Al examen neurológico se observó hiperexcitabilidad, temblor muscular en fascias, particularmente en cuello, hiperextensión en miembros anteriores al trote, ataxia leve en miembros posteriores, incoordinación de leve a moderada, temblor exacerbado en el cuello cuando caminaba al paso o se detenía y movimientos de hiperreflexia al examen de mucosas de cabeza y cuello. No se observaron lesiones de ningún tipo a nivel de cabeza, cuello, tronco ni miembros.

Dado el caso presentado y que la sintomatología descrita va empeorando con el correr del tiempo, se realizó la eutanasia del potrillo afectado siguiendo las normas de bienestar animal correspondientes. Se aplicó xilacina al 10 % 4cc y acepromazina 3cc i/v para provocar el derribo y luego se aplicó solución saturada de lidocaína al 50% i/v. Para realizar la necropsia, se hizo una sección de cuello a nivel de tercera cervical y se colocó en caja de tecnopor (poliestireno expandido) refrigerada con hielo y conservantes. Se trasladó a lugar de disección. La misma se realizó a las 6 horas de extraída la muestra y conservada en frío. La disección comenzó por cuello desde ligamento nuchal en la tercera cervical retirando todo el tejido blando y exponiendo las vértebras con el fin de no estropear la medula. En el cráneo se abrió una ventana desde anterior de la cara en un corte transversal a la altura de los ojos por debajo del lóbulo frontal y preservando la integridad de las meninges. En los laterales se cortó el hueso del mismo modo evitando lesionar las membranas. Se extrajo todo el cerebro, encéfalo y médula oblonga completos y contenidos en la membrana meníngea. Este material se sumergió en formol solución al 40% y después de 48 horas se cambió a solución al 60%. Esta muestra se llevó al Área Patología de Facultad de Veterinaria donde se dividió en un corte sagital del cerebro y encéfalo dejando 2 mitades simétricas. Una de las muestras quedó en este laboratorio, y la segunda se transportó en la misma solución de formol al laboratorio de DILAVE en el departamento de Treinta y Tres, ambos laboratorios donde se realizó el estudio histopatológico.

Estudios moleculares

Muestras sanguíneas anticoaguladas con EDTA del potrillo problema y de su madre fueron remitidas al laboratorio del Área Genética de Facultad de Veterinaria. De ambas muestras

se extrajo ADN empleando el kit de extracción *Quick-gDNATM* MiniPrep, (Zymo Research). La concentración y pureza del ADN obtenido se midió empleando el espectrofotómetro *NanodropTM* ND1000 (Thermofisher Scientific).

Las muestras de ADN del potrillo y de su madre se enviaron al “Veterinary Genetics Laboratory” (VGL) de la Universidad de Davis, EEUU (Dra. Cecilia Penedo) para confirmar el diagnóstico histopatológico por el test molecular.

Resultados y Discusión

Se presenta el caso clínico de un potrillo de 40 días de edad con sintomatología neurológica compatible con abiotrofia cerebelar. En nuestro país, aún no se ha confirmado el diagnóstico molecular de esta patología en equinos.

Según los informes de los laboratorios de Patología que realizaron los estudios macroscópicos e histopatológicos, exceptuando el cerebelo, el resto del sistema nervioso central se observó normal. En la mayoría de las láminas de cerebelo estudiadas la cantidad de células de Purkinje estuvo muy disminuida o eran casi inexistentes. Las neuronas de Purkinje existentes presentaban diferentes grados de degeneración, desde cromatólisis hasta necroapoptosis del pericario. En muchos casos los pericarios estaban dislocados encontrándose principalmente en la capa granulosa (Verdes, 2017).

Estudios moleculares

Los resultados de concentración de ADN de las dos muestras del potrillo en estudio fueron 24.9 ng/μl y 23.6 ng/μl mientras que la pureza fue 1.82 y 2.18 respectivamente. En el caso de su madre, la concentración fue de 29.6 ng/μl y la pureza de 2.09. Las concentraciones obtenidas en todos los casos fueron adecuadas para realizar el diagnóstico, respecto de la pureza, cuanto más cercano a 1.8 sea el valor obtenido, se pueden obtener mejores resultados, por lo que la primer muestra de las mencionadas del potrillo fue la que se envió a analizar. En el cuadro I se observan los genotipos obtenidos para ambos animales. El potrillo en estudio resultó homocigota para la mutación problema (AC/AC) mientras que su madre resultó portadora (N/AC). Estos resultados confirman la presencia de la mutación asociada a AC en caballos de raza Árabe en Uruguay. Por otra parte se pudo verificar la transmisión de padres a hijo. El padre del potrillo problema es portador del alelo causante de la AC, en este trabajo se está confirmando que la madre también es portadora. Al cruzarse estos dos animales nace el potrillo enfermo.

Estos resultados hacen considerar la posibilidad de que la mutación asociada a AC tenga una frecuencia alta en Uruguay,

Cuadro I. Genotipos obtenidos. P1: potrillo, M: madre.

| Muestra | Genotipo |
|---------|----------|
| P1 | AC/AC |
| M | N/AC |

dado el número de hembras que se cruzan con un determinado padrillo. Por otra parte se debe considerar que la aparición de sintomatología neurológica compatible con la abiotrofia cerebelar en equinos no es nueva. Dado que el presente diagnóstico confirma la presencia de AC, sería necesario realizar un estudio poblacional, con el fin de detectar animales portadores y determinar la incidencia de AC en caballos de la raza Árabe. Un estudio de este tipo permitiría obtener información de interés al momento de planificar cruzamientos. Por otra parte, es importante considerar que la AC también está descrita en animales cruza con Árabe y en razas relacionadas, donde también sería interesante realizar estudios moleculares con el fin de analizar cuál es la situación existente en Uruguay.

Agradecimientos

Se agradece al Dr. Fernando Dutra de DILAVE-MGAP y al Dr. José Manuel Verdes del Área Patología de Facultad de Veterinaria por los estudios histopatológicos y de anatomía patológica (macroscópica). También se agradece a la Dra. Cecilia Penedo del laboratorio VGL, de la Universidad de California, Davis, por los estudios de Genética Molecular confirmatorios.

Referencias bibliográficas

1. Brault LS, Cooper CA, Famula TR, Murray JD, Torres-Penedo MC. (2011a). Mapping of equine cerebellar abiotrophy to ECA2 and identification of a potential causative mutation affecting expression of MUTYH. *Genomics* 97: 121–129
2. Brault LS, Famula TR, Torres-Penedo MC. (2011b). Inheritance of cerebellar abiotrophy in Arabians. *AJVR*, Vol 72 (No. 7) 940-944
3. Cavalleri JMV, Metzger J, Hellige M, Lampe V, Stuckenschneider K, Tipold A, Beineke A, Becker K, Distl O, Feige K. (2013). Morphometric magnetic resonance imaging and genetic testing in cerebellar abiotrophy in Arabian horses. *BMC Veterinary Research* 9:105
4. Sadaba SA, Madariaga GJ, Corbi Botto CM, Carino MH, Zappa ME, Peral García P, Olguín SA, Massone A, Díaz S. (2016). First report of cerebellar abiotrophy in an Arabian foal from Argentina. *Open Veterinary Journal*, 6(3): 259-262
5. Scott EY, Torres-Penedo MC, Murray JD, Finno CJ. (2017). Defining Trends in Global Gene Expression in Arabian Horses with Cerebellar Abiotrophy. *Cerebellum*, 16(2). 462-472
6. Verdes JM. (2017). Informe de histopatología 17/103. Departamento de Patología, Facultad de Veterinaria, UdelaR.
7. Arabian Horse Association (2018) URL: https://www.arabianhorses.org/.content/aha-docs/Genetics_Cerebellar_Abiotrophy_Review.pdf Consultado en febrero de 2018.
8. UCDavis (2018). Cerebellar Abiotrophy URL: <https://www.vgl.ucdavis.edu/genomic/cerebellar/> Consultado en febrero de 2018.