

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
CAMPUS DE BOTUCATU**

**FREQUÊNCIA ALÉLICA DAS MUTAÇÕES RESPONSÁVEIS
PELA NEFROPATIA FAMILIAR (*COL4A4*:c.115A>T) E PELA
ATROFIA PROGRESSIVA DA RETINA(*PRCD*:c.5G>A) EM CÃES
DA RAÇA COCKER SPANIEL INGLÊS**

LARISSA ROCHA ANDRADE

Botucatu - SP
Março de 2019

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
CAMPUS DE BOTUCATU**

**FREQUÊNCIA ALÉLICA DAS MUTAÇÕES RESPONSÁVEIS
PELA NEFROPATIA FAMILIAR (*COL4A4*:c.115A>T) E PELA
ATROFIA PROGRESSIVA DA RETINA (*PRCD*:c.5G>A) EM CÃES
DA RAÇA COCKER SPANIEL INGLÊS**

LARISSA ROCHA ANDRADE

Dissertação apresentada junto ao
Programa de Pós-graduação em Medicina
Veterinária para obtenção do título de
Mestre.

Orientador: Prof. Ass. Dr. José Paes de
Oliveira Filho

Botucatu - SP

Março de 2019

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP

BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSANGELA APARECIDA LOBO-CRB 8/7500

Andrade, Larissa Rocha.

Frequência alélica das mutações responsáveis pela Nefropatia Familiar (*COL4A4*:c.115A>T) e pela Atrofia Progressiva da Retina (*PRCD*:c.5G>A) em cães da raça Cocker Spaniel Inglês / Larissa Rocha Andrade. - Botucatu, 2019

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

Orientador: José Paes de Oliveira Filho

Capes: 50501062

1. Cães - Doenças - Diagnóstico. 2. Rins - Doenças. 3. Retina - Atrofia. 4. Técnicas de genotipagem. 5. Doenças hereditárias.

Palavras-chave: Diagnóstico; Doença genética; Genotipagem; Nefropatia familiar; *PRCD*.

Nome do autor: Larissa Rocha Andrade

Título: FREQUÊNCIA ALÉLICA DAS MUTAÇÕES RESPONSÁVEIS PELA NEFROPATIA FAMILIAR (*COL4A4*:c.115A>T) E PELA ATROFIA PROGRESSIVA DA RETINA (*PRCD*:c.5G>A) EM CÃES DA RAÇA COCKER SPANIEL INGLÊS

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr. José Paes de Oliveira Filho
Orientador
Departamento de Clínica Veterinária
FMVZ - UNESP - Botucatu, SP

Prof. Dr. Alexandre Rodrigues Silva
Membro
Departamento de Ciências Animais
CCA - UFERSA – Mossoró, RN

Prof. Dr. Maria Lucia Gomes Lourenço
Membro
Departamento de Clínica Veterinária
FMVZ - UNESP - Botucatu, SP

Data da Defesa: 14 de março de 2019.

Agradecimentos

Aos meu pais, Jadir P. de Andrade e Maria de Lourdes Rocha Andrade e ao meu irmão Caio Rocha Andrade pelo amor incondicional e pelo apoio e incentivo em todos os momentos da minha vida.

Ao meu orientador, José Paes de Oliveira Filho, pela oportunidade de realização deste projeto, pelo apoio e ensinamentos.

A amiga Raíssa Oliveira Leite, que a pós-graduação me presenteou, pela amizade verdadeira, apoio, paciência e ajuda que foram imprescindíveis para finalização deste projeto. Não consigo expressar em palavras o tamanho da minha gratidão.

A amiga Anelize Trecenti, pelo acolhimento, pelos ensinamentos (técnicos e da vida), por estar presente em todos os momentos no decorrer deste período, me apoiando e ajudando tão prontamente.

Ao amigo Cristiano Bouéres, que desde a residência permanece ao meu lado demonstrando sua verdadeira amizade nas diversas circunstâncias da vida. Também é difícil expressar em palavras o quanto sou grata.

A amiga Ana Luisa Albuquerque que além de exercer também um papel importante na minha decisão de ingressar no mestrado, demonstrou sempre carinho e prontidão em ajudar em diversos aspectos da vida durante este período.

Aos amigos que a residência me presenteou, Natália Oliveira e Marcel Passos, que considero irmãos e que tiveram papel importante na minha decisão de ingressar no mestrado.

As minhas amigas, Thamires Voyagioglou e Priscila dos Santos que apesar da distância, estão sempre me apoiando e torcendo por mim. O apoio de vocês é essencial em toda etapa que realizo em minha vida.

Aos amigos da pós-graduação, Danilo G. A. de Andrade, que prestou apoio em momentos difíceis e decisivos, Campo Amor, Cesar Erineudo, Natália Dias, Natália Lourenço, pela convivência e ajuda durante o período de realização deste projeto.

Aos amigos da Unesp, André Mota, Gabriel Barbosa, Kamila Paim, Mariana Carvalho, pelo convívio e pelo suporte durante este período, nos bons momentos e também nos mais difíceis e a amiga Amanda Manara Caceres pelo empenho, disposição e companheirismo na realização deste projeto

Aos meu cockers, Michael, Captain e Sven, pelo amor incondicional, pela amizade simples e verdadeira, pela força que me dão em momentos tão difíceis e por me incentivarem a buscar sempre o melhor para essa raça tão especial.

Ao CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) pelo apoio financeiro ao projeto, possibilitando sua execução.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudo.

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I

TABELA 1	Número de registros da raça Cocker Spaniel Inglês no Brasil por ano e posição geral em relação as outras raças.	8
-----------------	--	---

CAPÍTULO II

TABELA 1	Resultados da avaliação oftálmica dos 28 Cocker Spaniel Inglês com queixa de alterações oftálmicas de acordo com o seu genótipo.	44
-----------------	---	----

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO II

- FIGURA 1 -** Eletroferograma de três cães da raça Cocker Spaniel Inglês.46
- FIGURA 2 -** Imagens de fundoscopia obtida com o ClearView™ Optical Imaging System (Optibrand®, USA) de dois cães da raça Cocker Spaniel Inglês. Observa-se a atenuação dos vasos retinianos no olho esquerdo (A) e direito (B) de um cão homozigoto recessivo para *prcd*-PRA, enquanto que os vasos retinianos do olho esquerdo (C) e direito (D) de um cão *wild type* para *prcd*-PRA apresenta-se normais.47
- FIGURA 3 -** Representação gráfica da resposta de bastonetes do eletrorretinograma de cão homozigoto afetado, da raça Cocker Spaniel Inglês, 8 anos de idade. Exame realizado com Sistema Eletrorretinográfico BPM 200.48
- FIGURA 4 -** Representação gráfica da resposta de cones do eletrorretinograma de cão homozigoto afetado, da raça Cocker Spaniel Inglês, 8 anos de idade. Exame realizado com Sistema Eletrorretinográfico BPM 200.49
- FIGURA 5 -** Representação gráfica da máxima resposta de cones do eletrorretinograma de cão homozigoto afetado, da raça Cocker Spaniel Inglês. Exame realizado com Sistema Eletrorretinográfico BPM 200.50

SUMÁRIO

Resumo.....	1
Abstract.....	2
CAPÍTULO I.....	3
1. Introdução.....	4
2. Revisão de literatura	7
2.1. A Raça.....	7
2.2. Importância das doenças genéticas nos cães.....	8
2.3. Nefropatia Familiar (FN).....	10
2.4. Atrofia Progressiva da Retina (PRA).....	13
2.5. Outras doenças genéticas no Cocker Spaniel Inglês	17
2.5.1. Síndrome da Mutilação Acral (AMS).....	17
2.5.2. Neuropatia do Adulto (AN).....	18
2.5.3. Distrofia do Epitélio Pigmentar da Retina.....	18
2.5.4. Glaucoma Primário.....	19
2.6. Justificativa e relevância desta pesquisa.....	20
3. Objetivos.....	21
3.1. Objetivo geral.....	21
3.2. Objetivo específico.....	21
4. Bibliografia.....	22
CAPÍTULO II.....	30
Trabalho redigido para submissão no periódico "Journal of Veterinary Diagnostic Investigation"	31
Título: Frequência alélica da mutação c.5G>A no gene <i>PRCD</i> responsável pela Atrofia Progressiva da Retina em cães da raça Cocker Spaniel Inglês.....	31
Normas de submissão: Instruções aos autores - JVDI.....	51
CAPÍTULO III.....	72
Trabalho redigido para submissão no periódico " The Veterinary Journal".....	73
Título: Frequência alélica da mutação c.115A>T no gene <i>COL4A4</i> responsável pela Nefropatia Familiar em cães da raça Cocker Spaniel Inglês.....	73
Normas de submissão: Instruções aos autores - The Veterinary Journal.....	81
CAPÍTULO IV.....	102
Considerações Finais.....	103

ANDRADE, L. R. **Frequência alélica das mutações responsáveis pela Nefropatia Familiar (*COL4A4*:c.115A>T) e pela Atrofia Progressiva da Retina (*PRCD*:c.5G>A) em cães da Raça Cocker Spaniel Inglês.** Botucatu – SP, 2019. 103p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu.

RESUMO

O estudo das doenças de origem genética em animais domésticos se torna cada vez mais relevante, sobretudo em cães, uma vez que estes animais podem servir como modelos experimentais para certas doenças em humanos. Além disso, o reconhecimento clínico de algumas destas enfermidades pode ser um entrave ao Médico Veterinário e em algumas ocasiões o teste genético que confirmaria a etiologia não está disponível no país. A Nefropatia Familiar (FN) causada pela mutação c.115A>T no gene colágeno tipo 4 α 4 (*COL4A4*), e a Atrofia Progressiva da Retina (*prcd*-PRA), causada pela mutação c.5G>A no gene da degeneração cone-bastonete progressiva (*PRCD*), se destacam entre as principais enfermidades hereditárias de origem genética que acometem cães da raça Cocker Spaniel Inglês (CSI). Até o momento a prevalência destas enfermidades nesta raça não havia sido verificada no Brasil, sendo assim, o objetivo deste estudo foi avaliar a frequência alélica destas mutações no CSI. Para tanto, foram genotipados 220 e 216 CSI para a *prcd*-PRA e FN, respectivamente. Fragmentos do DNA, contendo cada uma das mutações, foram amplificados por reação em cadeia da polimerase e submetidos ao sequenciamento gênico direto. A frequência alélica da mutação c.115A>T no gene *COL4A4* foi de 0,9% e da mutação c.5G>A no gene *PRCD* foi de 25,5%. Tais valores enfatizam a importância da realização dos testes de genotipagem nos cães da raça CSI como método de diagnóstico precoce principalmente para a orientação dos acasalamentos visando a redução de casos clínicos da doença.

Palavras chave: diagnóstico, doença genética, genotipagem, nefropatia familiar, *PRCD*.

ANDRADE, L. R. **Allelic frequencies of mutations responsible for Familial Nephropathy (*COL4A4*:C.115A>T) and Progressive Retinal Atrophy (*PRCD*:C.5G>A) in the English Cocker Spaniel**. Botucatu – SP, 2019. 103p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu.

ABSTRACT

The study of genetic diseases in domestic animals has become more relevant, especially in dogs, once these animals can serve as experimental models in the study of some human genetic diseases. Besides, these diseases can be hard to recognize on their clinical signs by the practitioners, and the genetic tests that can confirm them are usually available only abroad. Familial Nephropathy (FN) due to the mutation c.115A> T in the 4 α 4 collagen gene (*COL4A4*), and Progressive Retinal Atrophy (*prcd*-PRA) due to the mutation c.5G> A in the progressive rod cone degeneration gene (*PRCD*), are important genetic diseases of English Cocker Spaniel dogs (ECS) dogs. Since the prevalence of these diseases wasn't verified in Brazil so far, this study aims to evaluate the allelic frequencies of the mutations c.115A>T in the *COL4A4* gene and c.5G>A in the *PRCD* gene in English Cocker Spaniel dogs. For that, purified DNA from blood samples or buccal swab from 220 and 216 ECS for *prcd*-PRA and FN, respectively. DNA fragments with the mutation region were amplified by polymerase chain reaction and submitted to direct genomic sequencing. The allelic frequency of the mutation c.115A>T in the *COL4A4* gene was 0.9% and the c.5G>A in the *PRCD* gene was 25.5%. The results in this study emphasizes the importance to realize the genotyping test in ECS as an early diagnostic test, not only for trying an improvement of the affected dogs' life quality but also for breeding orientation to avoid clinical cases of the disease.

Key Words: diagnosis, genetic disease, genotyping, familial nephropathy, *prcd*-PRA.

CAPÍTULO I

1. Introdução

As doenças genéticas da espécie canina estão sendo cada vez mais estudadas, havendo 720 descritas até o momento, segundo o banco de dados do Online Mendelian Inheritance in Animal (OMIA, 2019). Tais estudos se tornam cada vez mais relevantes, uma vez que muitas delas, incluindo a Nefropatia Familiar (FN) e a Atrofia Progressiva da Retina (PRA), são análogas a doenças humanas, e portanto, o cão poderá servir como modelo experimental para ambas (Zangerl et al., 2006; Lees et al., 2013).

A Nefropatia Familiar, doença glomerular primária em cães, é descrita no CSI desde o fim dos anos 40. Achados de microscopia eletrônica de transmissão constataram, posteriormente, que as alterações glomerulares encontradas em cães afetados se assemelhavam à síndrome de Alport em humanos (Potter et al., 1985), termo que se refere a doenças hereditárias associadas a uma glomerulopatia progressiva, identificada pela primeira vez pelo médico Arthur Cecil Alport em 1927.

As anormalidades do colágeno tipo IV da membrana basal glomerular, que caracterizam a doença, foram associadas em humanos a mutações em três genes, que codificam as cadeias alfa-3 (*COL4A3*), alfa-4 (*COL4A4*) e alfa-5 (*COL4A5*) (Lemmink et al., 1994; Mochizuki et al., 1994, Knebelmann et al., 1996). Já em cães, há quatro mutações descritas, duas delas no gene *COL4A4* e duas no *COL4A5*.

As mutações no gene *COL4A5* se associam a doenças hereditárias ligadas ao cromossomo X, sendo caracterizadas pela falência renal progressiva, em humanos e cães, e pela surdez e lesões oculares em humanos (Knebelmann et al., 1996). Enquanto que as mutações nos genes *COL4A3* e *COL4A4* são autossômicas, ou seja, não são ligadas a cromossomos sexuais (Lemmink et al., 1994; Mochizuki et al., 1994).

No CSI a doença é autossômica recessiva e associada a mutação c.115A>T no gene *COL4A4*, que leva a formação de um stop codon prematuro no éxon 3 provocando a produção de uma proteína truncada afunional

(Davidson et al., 2007), que acarreta nas alterações da estrutura do colágeno e consequentemente prejudica o funcionamento glomerular (Katayama et al., 2014).

Os sinais clínicos caracterizam-se por insuficiência renal crônica, cursando com poliúria, polidipsia, perda de peso, vômito ou diarreia e se iniciam com idade entre seis e 24 meses, com predomínio ao redor dos 12 meses (Steward e MacDougall, 1984; Lees et al., 1998a). Nos exames laboratoriais a proteinúria persistente pode ser um indicativo da doença, que geralmente é progressiva e fatal, levando a falência renal em semanas ou poucos meses mesmo com tratamento (De Brot et al., 2017). O diagnóstico é feito pela microscopia eletrônica ou imunocoloração associado ao quadro clínico (Lees et al., 1998b). Deve-se descartar outras causas de insuficiência renal. Atualmente, há o teste genético que deve ser utilizado para o diagnóstico em conjunto com os citados anteriormente.

As doenças da retina em cães estão entre as mais frequentes e bem caracterizadas do grupo de doenças oculares hereditárias na espécie (Mellersh, 2014). O termo atrofia progressiva de retina (PRA) se refere ao conjunto de enfermidades genéticas encontradas em mais de 100 raças de cães, sendo que, atualmente são conhecidas em torno de 20 mutações em 18 genes diferentes responsáveis pela PRA (Miyadera et al., 2012; Downs et al., 2014).

O início dos sinais clínicos e sua forma de progressão variam entre as raças afetadas (Downs et al., 2014). No caso do CSI, em que a PRA é associada à degeneração de cone-bastonete progressiva (*prcd*-PRA), os sinais clínicos se manifestam de maneira geral, mais tardiamente, com idades variando entre três e 13 anos de idade (Zangerl et al., 2006).

A doença é caracterizada clinicamente pela perda da visão noturna (nictalopia), ocasionada pela morte dos bastonetes, que evolui gradativamente para a perda da visão diurna (hemeralopia), em consequência da morte dos cones, culminando em cegueira total bilateral (Patterson, 2000; Slatter, 2005; Aguirre-Hernández et al., 2007).

A *prcd*-PRA, que além do CSI acomete também outras raças, como Poodle miniatura, Cocker Spaniel Americano, Cão de Água Português, Labrador Retriever (Zangerl et al., 2006), é uma doença hereditária autossômica recessiva ocasionada pela mutação c.5G>A no gene da degeneração cone-bastonete progressiva (*PRCD*). Esta mutação leva à troca de uma guanina por uma adenina (TGC>TAC), que resultará na substituição de uma cisteína por uma tirosina no momento da tradução (Zangerl et al., 2006; Gentilini et al., 2009). A mesma mutação genética responsável pela *prcd*-PRA em cães causa a retinite pigmentosa ou retinose pigmentar em humanos, que por sua vez podem apresentar outras duas mutações no gene *PRCD* também associadas a retinose pigmentar.

Por se tratar de doenças hereditárias, a detecção precoce da mutação em heterozigose ou homozigose por técnicas moleculares permite a adoção de medidas de orientação de acasalamentos, visando a redução do número de casos clínicos ou até mesmo a erradicação da mutação na raça (Dave e Dave, 2014, Davidson et al., 2007).

Considerando que as duas enfermidades, FN e *prcd*-PRA, são importantes para os animais da raça Cocker Spaniel Inglês, o conhecimento das frequências alélicas das mutações responsáveis por estas enfermidades permitirá aos proprietários traçar estratégias para reduzir a ocorrência de casos clínicos. Além disso, a oferta testes genéticos, no Brasil, permitirá aos proprietários e aos Médicos Veterinários o diagnóstico etiológico destas enfermidades, de modo mais acessível que os testes realizados fora do país.

2. Revisão da literatura

2.1. A Raça

O Cocker Spaniel Inglês (CSI) é uma raça de origem britânica, pertencente ao grupo 8 (Levantadores, Retrievers e Cães de água), seção dos Levantadores de caça, de acordo com a classificação das raças caninas da *Fédération Cynologique Internationale* (FCI). Antes de ser reconhecido como raça separadamente, pertencia a família dos Spaniels, geralmente conhecidos como os mais antigos cães desenvolvidos para caça (Dodge, 1942).

Os Spaniels eram divididos de acordo com seu tamanho. Os maiores eram chamados de *Springing spaniels* e os menores, *Cocking spaniels*. Algumas características foram se alterando com o passar do tempo. Posteriormente esses cães foram divididos de acordo com o peso, acima ou abaixo de 11,3Kg e no ano de 1893, o *The Kennel Club* reconheceu separadamente a raça. Até 1901, os cães que participavam de exposições eram pesados antes entrar em pista e os que se encontravam acima do peso considerado ideal não poderiam ser utilizados como reprodutores. O Clube dos *Spaniels*, fundado em 1885, conseguiu abolir essa regra, demonstrando a maior importância do tipo do cão e não somente seu peso. A partir disso, a raça teve um maior progresso em sua evolução (Dodge, 1942; Lloyd, 1968).

Em 1902 foi fundado o *The Cocker Spaniel Club* (CSC) na Inglaterra e feito o primeiro padrão da raça. Os cães deveriam ser robustos, compactos, e bem balanceados com o objetivo de melhor desempenharem sua função nos campos, que era levantar a caça, mais especificamente *woodcocks*, uma espécie de galinhola, de onde se originou o nome da raça. (Lloyd, 1968)

O CSI é um cão de temperamento alegre, afetuoso e cheio de vida, jamais pode ser agressivo ou excessivamente tímido, que são faltas desqualificantes segundo o padrão oficial da raça (FCI). É um cão versátil, podendo desenvolver diferentes tipos de atividade e se adapta facilmente a vários ambientes, o que somado ao seu temperamento o torna uma raça popular entre os cães de

companhia (McKinney, ECSCA). O auge de popularidade da raça foi no século XX, e atualmente continua se destacando na Grã-Bretanha, sendo que nos anos de 2016 e 2017 a raça ocupou o segundo e terceiro lugar, respectivamente, no ranking de registros do *The Kennel Club*. Já no Brasil, o CSI não está entre as raças mais registradas pela Confederação Brasileira de Cinofilia (CBKC) (Tabela 1), que é a única entidade nacional filiada à maior organização cinológica mundial, a FCI, sediada na Bélgica, porém continua sendo muito escolhido como cão de companhia.

TABELA 1- Número de registros da raça Cocker Spaniel Inglês no Brasil por ano e posição geral em relação às outras raças.

Ano	Número de registros	Posição geral (entre 168 raças)
2013	252	51ª colocação
2014	299	51ª colocação
2015	291	52ª colocação
2016	290	50ª colocação
2017	302	50ª colocação

Fonte: Confederação Brasileira de Cinofilia (CBKC)

2.2. Importância das doenças genéticas nos cães

Os cães foram os primeiros mamíferos a serem domesticados. Considera-se que eles derivam de três linhagens de lobos, cada qual derivada de alguns ancestrais em comum (Bellumori et al., 2013). Eles se relacionam com os seres humanos há mais de 15000 anos, e vêm sendo selecionados de acordo com características morfológicas e comportamentais para desempenhar funções como caça, pastoreio, guarda ou simplesmente companhia (Vilà et al., 1997).

Atualmente existem cerca de 700 raças caninas e a criação delas vem se desenvolvendo principalmente a partir da metade do século XIX, com o advento dos clubes de raças e formações dos padrões de cada raça, em que os cães só

poderiam ser registrados se fossem filhos de pai e mãe previamente registrados (Parker et al., 2004). Os cruzamentos seletivos, o uso repetido de padreadores populares, o *inbreeding* de maneira geral, tão importantes para “fixação” de características morfológicas desejáveis são exemplos de práticas de criação que garantiram um baixo *pool* genético entre os cães de determinada raça, contribuindo com a perda de variabilidade genética, sendo que cada raça forma populações genéticas isoladas (André et al., 2008; Cruz et al., 2008; Bellumori, et al. 2013). Com isso, as doenças genéticas se perpetuaram consideravelmente na espécie canina, que após a humana é uma das mais estudadas geneticamente.

O primeiro genoma canino completo foi publicado em 2003 (Kirkness et al 2003), e sua versão mais recente foi publicada em 2012, de cães de várias raças (Hoepfner et al., 2014). O genoma é constituído de 39 pares de cromossomos, sendo 38 pares de autossomos e um par de cromossomos sexuais (XX e XY). Existem aproximadamente 19000 genes descritos (André et al., 2008). O número de doenças genéticas relatadas na espécie é de 720 até o ano de 2018, das quais 245 foram encontradas a mutação responsável, segundo o banco de dados do *Online Mendelian Inheritance in Animal* (OMIA, 2019). Essas doenças podem estar restritas a algumas raças ou grupos de raças, que frequentemente compartilham padrões alélicos similares (Parker et al., 2004). Muitas doenças genéticas da espécie canina são análogas a de humanos, podendo estes servirem como modelos experimentais para estas doenças. De acordo com o OMIA (2019), 421 doenças genéticas de cães são modelos potenciais para doenças humanas e seus tratamentos.

As doenças genéticas ocorrem devido a mutações que, dentre outras formas podem se classificar como: substituição, deleção ou inserção. A herança dessas doenças pode ser controlada por um único gene (monogênicas) ou por vários genes (poligênicas). As monogênicas, também conhecidas como mendelianas, podem ser herdadas principalmente das seguintes maneiras: autossômica recessiva, quando o animal apresenta duas cópias do alelo recessivo; autossômica dominante, quando apenas um alelo dominante já gera sinais clínicos ou ligadas ao cromossomo X. A forma mais comum de herança

das doenças genéticas na espécie canina é a autossômica recessiva e como os animais heterozigotos comumente não apresentam sinais clínicos, o alelo recessivo vai se distribuindo pela população silenciosamente, podendo levar anos até o aparecimento de um animal homozigoto recessivo (Summers et al., 2010).

Conhecer a prevalência das doenças genéticas torna-se importante na criação de cães, pois a partir de métodos como testes genéticos que detectam determinada mutação, em homozigose ou heterozigose, pode-se guiar acasalamentos, evitando o nascimento de filhotes afetados.

2.3. Nefropatia Familiar

A Nefropatia Familiar é o termo diagnóstico mundialmente usado para se referir à nefropatia hereditária autossômica recessiva, uma doença glomerular primária em cães (Davidson et al., 2007). Descrita no CSI desde o fim dos anos 40, como uma nefropatia juvenil, primeiramente chamada de hipoplasia cortical renal (Krook, 1957), sendo a primeira doença renal de caráter hereditário relatada em cães. Desde então, vários trabalhos descreveram achados clínicos e laboratoriais desta enfermidade no CSI (Steward et al., 1984; Robinson et al., 1985; Koeman et al., 1989), refletindo sua importância para esta raça.

Quando estudos na década de 80 demonstraram que a herança da doença no CSI é autossômica recessiva (Steward et al., 1984; Potter et al., 1985), o *The Cocker Spaniel Club* (CSC), associação máxima da raça, sediado na Inglaterra, estabeleceu um esquema de controle em que os padreadores e matrizes que produziram cães confirmadamente afetados eram retirados da reprodução e uma lista desses animais carreadores foi publicada para consulta dos criadores (CSC).

Também no início da década de 80, utilizando a microscopia eletrônica observou-se semelhança entre as alterações da membrana basal glomerular de cães afetados e de seres humanos com Síndrome de Alport (Potter et al., 1985), termo que se refere ao grupo de doenças hereditárias associadas a uma

glomerulopatia progressiva (Knebelmann et al., 1996). Além disso, pacientes humanos portadores desta síndrome frequentemente apresentam alterações visuais e auditivas (Gregory e Atkin, 1993), o que constitui a principal diferença entre esta e a nefropatia hereditária dos cães (Davidson, et al., 2007).

Estudos realizados em humanos a partir dessa década demonstraram que a doença é caracterizada por anormalidades na rede de colágeno tipo IV da membrana basal glomerular, que é responsável pela estrutura e função dos capilares glomerulares (Lemmink et al., 1994; Mochizuki et al., 1994). Há seis cadeias de colágeno tipo IV ($\alpha 1$ a $\alpha 6$), que se organizam em três conjuntos de trímeros ($\alpha 1.\alpha 1.\alpha 2$, $\alpha 3.\alpha 4.\alpha 5$ e $\alpha 5.\alpha 5.\alpha 6$), formando as redes de colágeno que compõe a estrutura das membranas basais (Davidson, et al., 2007). Cada cadeia é codificada por um gene diferente, *COL4A1*, *COL4A2*, *COL4A3*, *COL4A4*, *COL4A5* e *COL4A6*. Mutações nos genes que codificam as cadeias $\alpha 3$ (*COL4A3*), $\alpha 4$ (*COL4A4*) e $\alpha 5$ (*COL4A5*), já foram associadas a síndrome de Alport em humanos (Lemmink et al., 1994; Mochizuki et al., 1994, Knebelmann et al., 1996).

Mutações no gene *COL4A5* são associadas a uma nefropatia hereditária ligada ao cromossomo X, que em humanos caracteriza-se pela falência renal progressiva, surdez e lesões oculares (Knebelmann et al., 1996). Em cães, a primeira mutação identificada neste gene foi uma substituição do nucleotídeo G por T no éxon 3, em exemplares da raça Samoieta (Zheng et al., 1994) e uma outra mutação (deleção de 10 pares de base no éxon 9) foi encontrada em uma família de cães sem raça definida (Cox et al., 2003). Já as mutações nos genes *COL4A3* e *COL4A4* são autossômicas, ou seja, não são ligadas a cromossomos sexuais e podem ser recessivas ou dominantes (Lemmink et al., 1994; Mochizuki et al., 1994). Tais genes se encontram no cromossomo dois em humanos e no cromossomo 25 em cães.

Em 2007, uma mutação no gene *COL4A4*, que codifica a cadeia $\alpha 4$ do colágeno tipo IV, foi identificada no CSI e constitui um polimorfismo de base única (c.115A>T) no éxon três deste gene, que provoca uma mutação “sem sentido”, ou seja, há a troca de uma lisina por um *stop códon*, o que provoca a

produção de uma proteína truncada afuncional (Davidson et al., 2007). Posteriormente, foi identificada uma outra mutação, também de herança autossômica recessiva (c.2806C>T), no gene *COL4A4*, na raça Springer Spaniel Inglês (Nowend et al., 2012). Essas duas mutações, e as outras duas no gene *COL4A5*, até o momento são as únicas identificadas na espécie canina que se associam a doenças glomerulares causadas por anormalidades de colágeno tipo IV. As quatro mutações levam formação de cadeias incompletas, não permitindo a formação das redes de colágeno tipo IV e consequentemente alterando a estrutura e função da membrana basal glomerular (Lees et al., 2013).

A nefropatia familiar afeta geralmente cães com idade entre seis e 24 meses (Steward et al., 1984; Lees et al., 1998a) que apresentam insuficiência renal crônica, sendo os principais sinais clínicos: inapetência, poliúria, polidipsia, perda de peso, vômito ou diarreia. A primeira alteração laboratorial esperada é a proteinúria que pode iniciar entre as idades de dois e oito meses, porém é mais frequente entre quatro e seis meses (Lees et al., 2013). As outras alterações esperadas nos exames laboratoriais são: aumento das concentrações séricas de ureia e creatinina, hipofosfatemia, acidose metabólica, diminuição da densidade urinária e proteinúria persistente. A doença geralmente é progressiva e fatal, levando à falência renal frequentemente ao redor dos 12 meses de idade, com evolução de semanas ou poucos meses, mesmo com tratamento (De Brot et al., 2017).

Para o diagnóstico da FN deve-se descartar outras causas de insuficiência renal. Métodos mais especializados podem ser necessários, tais como a microscopia eletrônica e a imunohistoquímica, que são realizadas a partir de amostras de tecido renal coletados por biopsia ou obtidos na necropsia. As alterações estruturais da membrana basal glomerular vistas na microscopia eletrônica, não necessariamente estão relacionadas ao colágeno tipo IV. Para este diagnóstico mais específico seria necessária a realização de imunohistoquímica que não é amplamente disponível (Lees et al., 1998b, Lees, 2013). Atualmente, há o teste genético que também pode ser utilizado para diagnóstico. Além desta utilidade, o teste genético também se torna importante para orientar acasalamentos, evitando-se a utilização de dois animais

heterozigotos, evitando assim o nascimento de cães afetados para a mutação, ou até mesmo eliminá-la do pool genético do CSI (Davidson et al., 2007).

2.4. Atrofia Progressiva da Retina (PRA)

Dentre os grupos de doenças genéticas da espécie canina, as doenças oculares estão entre as que são melhores descritas, provavelmente devido à facilidade em avaliar o olho por técnicas não invasivas (Mellersh, 2014). Além disso, muitos clubes de raças caninas em diversos países exigem que antes de iniciar vida reprodutiva, os cães passem por uma triagem oftalmológica para doenças oculares hereditárias, o que contribui para a identificação e os estudos dessas enfermidades. Essas triagens são padronizadas por associações de oftalmologistas veterinários, como o *American College of Veterinary Ophthalmology* (ACVO) e o *European College of Veterinary Ophthalmology* (ECVO). Na Europa a *British Veterinary Association* (BVA) também conta com um esquema de avaliação oftalmológica para cães de raça por membros credenciados, cujo intuito, além de evitar a reprodução de cães com doenças oculares, é de facilitar o reconhecimento de novos problemas. As doenças da retina e da lente são as mais prevalentes segundo o *Online Mendelian Inheritance in Animal database* (OMIA, 2019).

As doenças da retina podem ser divididas em dois grupos: as degenerativas, em que as células se desenvolvem normalmente até certo período da vida do cão e depois começam a degenerar, geralmente com progressão mais lenta; e as de desenvolvimento, em que a retina já se desenvolve anormalmente, com graves alterações estruturais e, ao contrário das degenerativas costumam ter um desenvolvimento mais rápido. (Mellersh, 2014; Gelatt, 2013)

A maioria das doenças da retina são degenerativas, sendo o tipo mais comum a Atrofia Progressiva da Retina (PRA), que é um termo coletivo que se refere ao conjunto de enfermidades genéticas encontradas em mais de 100 raças de cães. Sua primeira descrição em cães foi em 1909 na raça Setter

Gordon (Magnusson, 1909, apud Miyadera et al., 2012) e são conhecidas em torno de 20 mutações em 18 genes diferentes responsáveis pela PRA (Miyadera et al., 2012; Downs et al., 2014). São enfermidades progressivas, degenerativas bilaterais que envolvem os fotorreceptores, cones ou bastonetes ou ambos.

A PRA associada à degeneração de cone-bastonete progressiva (*prcd*-PRA) é uma doença hereditária autossômica recessiva ocasionada por uma mutação no gene da degeneração cone-bastonete progressiva (*PRCD*). É a forma mais comum de PRA e a que acomete o CSI, além de outras raças como Poodle Miniatura, Cocker Spaniel Americano, Cão de Água Português e Labrador Retriever (Petersen-Jones, 2005; Zangerl et al., 2006). A doença foi primeiramente descrita em Poodle Miniatura (Aguirre et al., 1982) e mais de 50 raças já apresentaram essa mutação (OptiGen®, LLC, 2018). O início dos sinais clínicos e a forma de progressão variam entre as raças afetadas (Downs et al., 2014). Pode haver fenótipos semelhantes associados a mutações distintas em genes diferentes (Mellersh, 2014), assim como, por vezes, fenótipos diferentes, até mesmo quando se trata da mesma mutação, como ocorre com o Poodle Miniatura e o CSI. Neste último, a doença é mais tardia e progride mais lentamente, podendo também ter curso mais variável (Aguirre et al., 1988).

O diagnóstico clínico é observado no CSI entre três e 13 anos de idade (Zangerl et al., 2006). A doença envolve inicialmente os bastonetes, o que implica em perda de visão noturna (nyctalopia) como primeiro sinal clínico observado, principalmente quando o cão não está familiarizado ao ambiente. A condição progride, em geral lentamente, e passa a envolver os cones, levando a perda de visão também durante o dia. Nesse estágio, os sinais incluem a presença de diminuição do reflexo pupilar à luz e dilatação pupilar a luz do ambiente (Crispin et al., 2008), porém o reflexo pupilar pode estar presente até determinado grau da doença, inclusive em estágios avançados (Yogo et al., 2011). O desenvolvimento de catarata secundária é comum, acelerando, em geral, a perda da visão (Crispin et al., 2008; Gomes et al., 2013). Em um estudo com 136 cães da raça CSI, com idade variando entre três e 15 anos, que apresentavam catarata e baixa acuidade visual, 89,70% também foram diagnosticados com PRA (Safatle et al., 2010).

As anormalidades iniciais do exame de fundo de olho (fundoscopia) geralmente aparecem no CSI no período entre quatro e oito anos de idade (Gelatt, 2013). Esse exame revela hiperreflexia generalizada e bilateralmente simétrica da área tapetal, em decorrência da atrofia de retina, atenuação vascular, principalmente das arteríolas peripapilares que podem se tornar quase invisíveis e, conforme a doença progride, ocorre perda de pigmento ou pigmentação anormal da área não-tapetal (Slatter, 2005; Crispin et al., 2008). Especificamente na raça CSI, as alterações desse exame podem ser semelhantes às previamente descritas ou podem variar de acordo com as diferentes áreas de fundo, podendo-se observar hipo ou hiperreflexia ao longo do eixo visual ao centro de cada lado do disco óptico, enquanto uma aparência marrom acinzentada ou mesmo uma aparência normal são notadas em outras áreas (Gelatt, 2013).

O eletrorretinograma (ERG) é um meio diagnóstico não invasivo, capaz de avaliar a função retiniana, sendo útil nos casos em que não é possível visualizar o fundo de olho através da fundoscopia, como nos casos de catarata. É também mais sensível que esse último exame, principalmente quando a lesão é sutil e em fase inicial ou quando nele ainda não foram visualizadas alterações, pois pode detectar precocemente lesões em suas camadas mais externas (Komaromy et al., 1998, Safatle et al., 2010; Gelatt, 2013). Nos cães da raça CSI que apresentam PRA, o ERG apresenta anormalidades funcionais indicativas de degeneração de cone-bastonete progressiva entre um e dois anos de idade. Há relatos de alguns poucos casos cujas alterações no ERG foram imperceptíveis até os dois anos e meio de idade (Gelatt, 2013).

A mutação c.5G>A no gene *PRCD* leva à troca de uma guanina por uma adenina (TGC>TAC), que resultará na substituição de uma cisteína por uma tirosina no momento da tradução (Zangerl et al., 2006; Gentilini et al., 2009). O *PRCD* é um gene conservado que codifica uma proteína de 54 aminoácidos no cão e no ser humano. Na retina do cão ele se expressa no epitélio pigmentar da retina, nos fotorreceptores e na camada de células ganglionares. (Remez et al., 2014). Embora sua função não seja totalmente conhecida, sabe-se de sua importância para a manutenção da estrutura, função e sobrevivência dos

fotorreceptores. (Zangerl et al., 2006; Spencer et al., 2016). Uma vez que a mesma mutação genética responsável pela *prcd*-PRA em cães causa a retinite pigmentosa ou retinose pigmentar em humanos, inclusive com os sinais típicos da doença, que são a atenuação dos vasos da retina e pigmentação, cães com esta mutação poderão servir como modelo experimental para o estudo da doença em humanos (Zangerl et al., 2006).

As técnicas moleculares realizadas a partir de pequenas amostras de sangue ou de swab bucal analisam a região específica do gene onde se encontra a mutação responsável pela doença, podendo detectá-la tanto em homozigose quanto em heterozigose. O resultado permite a separação de cães em três grupos: homozigoto normal ou *wild type* - que não apresenta nenhum alelo mutado (N/N); heterozigoto - que apresenta um alelo mutado e outro normal (*prcd*/N) e homozigoto mutante ou afetado - que apresenta dois alelos mutados (*prcd*/*prcd*). Os cães geneticamente normais são classificados como Tipo A. O Tipo B - heterozigoto - não manifestará sinais clínicos da doença, mas pode produzir animais afetados se acasalado com outro cão heterozigoto ou com um cão homozigoto afetado. O afetado, Tipo C, está em risco de desenvolver PRA. O ERG é recomendado para a confirmação. A frequência de cães da raça CSI, provenientes de países de todo o mundo, testados como heterozigotos entre os anos de 2000 a 2012, se apresentou sempre em torno de 40% (OptiGen®, 2018). Em CSI de toda a Europa, no período de 2012 a 2016, a frequência média de heterozigotos para a mutação foi de 32% de heterozigotos (Laboklin, 2017).

Apesar do diagnóstico clínico da doença poder ser realizado por exames oftalmológicos de fundo de olho e pelo ERG (Dave e Dave, 2014), por se tratar de uma doença hereditária, a detecção precoce da mutação em heterozigose ou homozigose por técnicas moleculares permite a adoção de medidas de orientação de acasalamentos, visando a redução do número de casos clínicos de *prcd*-PRA (Dave e Dave, 2014), tratando-se de um método de controle fundamental, uma vez que há muitos cães assintomáticos até a idade de início da vida reprodutiva. Além disso, a detecção precoce é importante pois o tratamento mais acessível, embora controverso, previne ou retarda a progressão da degeneração retiniana, mas não pode reverter danos já ocorridos. Este

tratamento consiste na administração de suplemento vitamínico antioxidante, como vitaminas C e E, carotenoides, ácidos graxos e zinco (Gomes et al., 2013). Considerando que a *prcd*-PRA é importante para os animais da raça CSI, o conhecimento da frequência alélica desta mutação permitirá aos criadores e proprietários traçar estratégias para reduzir a ocorrência de casos clínicos.

2.5. Outras doenças genéticas no Cocker Spaniel Inglês

2.5.1. Síndrome de Mutilação Acral (AMS)

A Síndrome de Mutilação Acral, termo em português para Acral Mutilation Syndrome, é uma rara neuropatia periférica sensorial degenerativa, herdada de maneira autossômica recessiva e descrita inicialmente no Braco Alemão de Pelo Curto, e posteriormente em outras raças como Springer Spaniel Inglês e o Pointer Inglês; especificamente no CSI, a AMS está associada a cães de linhagem de trabalho (Plassais et al., 2016; CSC, 2018). A doença se caracteriza pela insensibilidade dolorosa nas extremidades distais, sem alterações motoras ou de propriocepção (Plassais et al., 2016). A patogenia envolve o desenvolvimento dos neurônios sensoriais primários e depois ocorre uma degeneração progressiva das fibras desmielinizadas.

Os sinais se manifestam em filhotes com cerca de 4 meses de idade, podendo variar de 2 a 12 meses, que mutilam suas extremidades distais, mastigando e lambendo-as, mas assim que nascem já podem ser identificados pela ausência de nocicepção (Cummings et al., 1983; Paradis et al., 2005). As patas apresentam edema e úlceras, podendo inclusive ocorrer fraturas e amputação de dígito. O diagnóstico é realizado com base no histórico, sinais clínicos e predisposição racial. Não há tratamento eficaz, a tentativa de evitar automutilação com uso de colar elisabetano e bandagens é paliativa e os animais geralmente são submetidos a eutanásia. Em 2016, Plassais et al. descreveram a mutação no gene *GNDF* associada a doença em cães de caça. O teste genético vem sendo realizado na Europa e, segundo dados de 2016, a

prevalência de heterozigotos para a mutação em CSI na Inglaterra é de 12% (Antagene, 2019).

2.5.2. Neuropatia do Adulto (AN)

Neuropatia do Adulto (AN) é o termo em português para Adult Onset Neuropathy, uma doença neurológica degenerativa, herdada também de maneira autossômica recessiva, sendo a mutação reconhecida por pesquisadores da Universidade de Missouri no ano de 2014 (ECSCA Health and Rescue, 2019). Os sintomas se iniciam geralmente entre 7 e 9 anos, se assemelham a mielopatia degenerativa, porém com progressão mais lenta (3 a 4 anos) e incluem fraqueza e instabilidade de membros pélvicos, eventualmente progredindo para membros torácicos. Pode haver dificuldade de deglutição. Dos cães acometidos pela doença e testados geneticamente para mielopatia degenerativa nenhum foi identificado como afetado. Acreditava-se que a doença acometia somente a variedade de cores sólidas da raça, porém, atualmente, já foram encontrados *partcolors* homozigotos afetados para a mutação. Apesar de diagnosticada clinicamente apenas em CSI, a mutação já foi encontrada em homozigose em cães da raça Field Spaniel. Dados de dezembro de 2018 revelaram que dos 1,324 CSI testados mundialmente, 22,2% são heterozigotos e 4,3% homozigotos afetados (Orthopedic Foundation for Animals – OFA, 2019).

2.5.3. Distrofia do Epitélio Pigmentar da Retina

Na distrofia do epitélio pigmentar da retina, antes conhecida como Atrofia Progressiva de Retina Central, ocorre degeneração dos fotorreceptores associada ao acúmulo de lipopigmento (fucsina) autofluorescente nas células do epitélio pigmentado da retina, principalmente na área central da região tapetal, o que a faz ser reconhecida pela presença de pigmento marrom nessa região. Hiperreflexia da área tapetal, que ocorre devido à degeneração retiniana e atenuação dos vasos da retina também são sinais clínicos observados no exame de fundo de olho. A progressão é lenta e nem sempre ocorre cegueira total

(McLellan et al., 2002). O déficit visual só ocorre em estágios moderadamente avançados (Gelatt, 2013) e foi primeiramente observado em CSI com idade entre 2,5 e 4,5 anos.

No CSI essa condição foi associada a deficiência de vitamina E, sem evidência de déficit de dieta ou má-absorção gastrointestinal, sendo, portanto, primária, devido a um metabolismo alterado hereditário, e sinais neurológicos, como ataxia e déficits proprioceptivos, também foram observados (McLellan et al., 2003). É uma das doenças hereditárias da raça CSI, segundo esquema de avaliação oftalmológica da *British Veterinary Association* (BVA).

2.5.4. Glaucoma Primário

O Glaucoma Primário é uma doença ocular progressiva e dolorosa, caracterizada pelo aumento da pressão intraocular que ocorre devido à redução na drenagem do humor aquoso pelo ângulo iridocorneal, na ausência de doenças oculares concomitantes. Se não tratado rapidamente pode ocasionar danos nas células ganglionares da retina e seus axônios, levando a perda de visão e cegueira (Mellersh, 2014).

O glaucoma primário pode ser classificado em: glaucoma primário de ângulo aberto ou fechado. O glaucoma primário de ângulo fechado é a forma mais comum em cães, que começam a apresentar sinais com idade de 4 a 10 anos (Komáromy e Petersen-Jones, 2015). No CSI, o glaucoma de ângulo fechado ocorre com frequência e observa-se além da entrada ciliar reduzida (estreita), fibras pectinadas pouco definidas (Bedford, 1977), caracterizando uma goniodisgenese. O diagnóstico pode ser realizado por tonometria e gonioscopia. A predisposição ao desenvolvimento de glaucoma pode ser determinada pela gonioscopia, nos casos de glaucoma primário de ângulo fechado, que é recomendada nas idades de um, quatro e sete a oito anos (BVA).

A forma de herança do glaucoma primário de ângulo fechado ainda não está bem determinada, porém por ocorrer em raças específicas e em linhagens predispostas, indica que a doença seja genética, sendo, portanto, listada entre

as três doenças oculares hereditária da raça CSI (BVA). Existe uma mutação bem caracterizada no gene ADAMTS10 associada a glaucoma primário de ângulo aberto em Beagles (Kuchtey et al., 2011).

2.6. Justificativa e relevância desta pesquisa

O estudo das doenças de origem genética em animais domésticos se torna cada vez mais relevante, sobretudo em cães, uma vez que muitas delas, incluindo a Nefropatia Familiar (FN) e a Atrofia Progressiva da Retina(PRA), são análogas a doenças humanas, e portanto, o cão pode servir como modelo experimental para ambas (Zangerl et al., 2006; Lees et al., 2013).

Entre as 720 doenças genéticas relatadas na espécie canina até o momento, a mutação responsável já foi identificada em 245 delas, segundo o banco de dados do Online Mendelian Inheritance in Animal (OMIA, 2019). O reconhecimento clínico de algumas destas enfermidades pode ser um entrave ao Médico Veterinário e em algumas ocasiões o teste genético que confirmaria a etiologia não está disponível no país.

Apesar das mutações responsáveis pela *prcd*-PRA e FN no Cocker Spaniel Inglês terem sido descritas há mais de 10 anos, há poucos estudos de prevalência no mundo. A mutação associada a FN foi observada anteriormente em cães dos EUA e Grã-Bretanha, de onde foram importados padreadores para o Brasil ao longo dos anos de criação da raça, porém não houve estudos sobre sua distribuição e frequência ao redor do mundo. (Davidson et al., 2007). No Brasil há relatos de casos clínicos de PRA, que se encontra entre as doenças oculares para as quais a raça apresenta predisposição. No entanto a frequência da mutação associada a esta doença no CSI também não foi verificada no país.

A realização de um levantamento das doenças genéticas observadas nas diferentes raças caninas torna-se importante na criação de cães, pois a partir de métodos como testes genéticos que detectam determinada mutação, em homozigose ou heterozigose, pode-se guiar acasalamentos, evitando o nascimento de filhotes afetados.

3. Objetivos

3.1. Objetivo geral

Verificar o perfil das doenças genéticas Nefropatia Familiar (FN) e Atrofia Progressiva da Retina (PRA) em cães da raça Cocker Spaniel Inglês na criação brasileira.

3.2 Objetivo específico

Estimar a frequência alélica das mutações c.115A>T no gene *COL4A4* responsável pela Nefropatia Familiar (FN) e c.5G>A no gene *PRCD* responsável pela Atrofia Progressiva da Retina (PRA) em cães da raça Cocker Spaniel Inglês.

4. Bibliografia

AGUIRRE, G.; ALLIGOOD, J.; O'BRIEN, P.; BUYUKMIHCI, N. Pathogenesis of progressive rod-cone degeneration in Miniature Poodles. **Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.**, v.23, p.610-630, 1982.

AGUIRRE, G.D.; ACLAND, G.M. Variation in retinal degeneration phenotype inherited at the prcd locus. **Exp. Eye Res.**, v.46, p.663-687, 1988.

AGUIRRE-HERNÁNDEZ, J.; WICKSTRÖM, K.; SARGAN, D.R. The Finnish lapphund retinal atrophy locus maps to the centromeric region of CFA9. **BMC Vet. Res.**, v.3, n.14, 2007.

ANDRÉ, C.; CHAUDIEU, G.; THOMAS, A.; JONGH, O.; JEGOU J-P.; CHAHORY, S.; CLERC, B.; PILORGE, P.; BRENAC, O. Hereditary retinopathies in the dog: genetic fundamentals and genetic tests. **Prat. Med. Chir. Anim. Cie.**, v.43, p.75-84, 2008.

Antagene. Disponível em <<https://www.antagene.com/en/no/figures-ams-english-cocker-spaniel-england>> Acesso em 12 de setembro de 2018.

BEDFORD, P.G. A gonioscopic study of the iridocorneal angle in the English and American breeds of cocker spaniel and the basset hound. **J. Small Anim. Pract.**, v.18, p.631-642, 1977.

BELLUMORI, T.P.; FAMULA, T.R.; D.L.; BANNASCH, D.L.; BELANGER, J.M.; OBERBAUER, A.M. Prevalence of inherited disorders among mixed-breed and purebred dogs: 27,254 cases (1995-2010). **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, v.11, p.1549-1555, 2013.

British Veterinary Association (BVA). Disponível em <<https://www.bva.co.uk/Canine-Health-Schemes/Eye-scheme/>> Acesso em 10 de setembro de 2018.

Confederação Brasileira de Cinofilia (CBKC). Disponível em <<http://cbkc.org/cbkc/estatisticas>> Acesso em 10 de setembro de 2018.

COX, M.L.; LEES, G.E.; KASHTAN, C.E. Genetic cause of X-linked Alport syndrome in a family of domestic dogs. **Mamm. Genome**, v.14, p.396-403, 2003.

CRISPIN, S.; GOULD, D.; ELLIS, S.; MOULD, J.; RENWICK, P.; SAMPSON, J. Hereditary eye disease in dogs. **In Practice**, v.30, p.2-14, 2008.

CRUZ, F.; VILA, C.; WEBSTER, M. The legacy of domestication: accumulation of deleterious mutations in the dog genome. **Mol. Biol. Evol.**, v.25, n.11, p.2331-2336, 2008.

CUMMINGS, J.F.; DE LAHUNTA, A.; BRAUND, K.G.; MITCHELL, W.J. Hereditary sensory neuropathy. Nociceptive loss and acral mutilation in pointer dogs: canine hereditary sensory neuropathy. **Am. J. Pathol.**, v.112, p.136-138, 1983.

DAVE, U.; DAVE, C.J. Involvement of PRCD and RPGR Genes in Progressive Retinal Atrophy in Locally Bred Canines. **J. Mol. Biomark. Diagn.**, v.5, n.1, 2014.

DAVIDSON, A.G.; BELL R.J.; LEES, G.E.; KASHTAN, C.E.; DAVIDSON, G.S.; MURPHY, K.E. Genetic cause of autosomal recessive hereditary nephropathy in the English Cocker Spaniel. **J. Vet. Intern. Med.**, v.21, p.394-401, 2007.

DE BROT, S.; ADAMANY, J.; BAIKER, K.; DHUMEAUX, M.; ALLEGRUCCI, C.; POLLEDO, I.; GRAU-ROMA, L. Pathology in practice. Hereditary nephropathy (familial nephropathy) in an english cocker spaniel. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, v.251, n.6, p.661-664, 2017.

DODGE, C.R. The English Cocker Spaniel in America. 1.ed. USA: The Scribner Press, 1942. 278p.

DOSTAL, J.; HRDLICOVA, A.; HORAK, P. Progressive rod-cone degeneration (*PRCD*) in selected dog breeds and variability in its phenotypic expression. **Vet. Med. (Praha)**, v.56, n.5, p.243-247, 2011.

DOWNS, L.M.; HITTI, R.; PREGNOLATO, S.; MELLERSH, C.S. Genetic screening for PRA-associated mutations in multiple dog breeds shows that PRA is heterogeneous within and between breeds. **Vet. Ophthalmol.**, v.17, n.2, p.126-130, 2014.

English Cocker Spaniel Club of America (ECSCA). Disponível em <<http://www.ecsca.info/index.php/breed-info/general-overview/2uncategorised/11-what-is-an-english-cocker-spaniel>> Acesso em 7 de setembro de 2018.

English Cocker Spaniel Club of America Health and Rescue Organization – Optigen. Disponível em: <<http://ecscahealthandrescue.org/2013-07-11-04-01-05/prcd-pra>> Acesso em 7 de setembro de 2018.

GELATT, K.N. Veterinary Ophthalmology. 5.ed. USA: Lippincott Williams and Wilkins, 2013. 2264p.

GENTILINI, F.; ROVESTI, G.L.; TURBA, M.E. Real-Time Detection of the Mutation Responsible for Progressive Rod-Cone Degeneration in Labrador Retriever Dogs Using Locked Nucleic Acid TaqMan Probes. **J. Vet. Diagn. Invest.**, v.21, p.689-692, 2009.

GOMES, D.; OTSUKI, D. A.; LISAK, R.; SAFATLE, A.V.M. Atrofia progressiva generalizada da retina em cães da raça Cocker Spaniel. **Cienc. Rural**, Santa Maria, v.43, n.8, p.1405-1414, 2013.

GREGORY, M.C.; ATKIN, C.L. Alport syndrome. In: Schrier, R.W.; Gottschalk, C.W.; Eds. Diseases of the Kidney. 5th Ed. Boston: Little Brown: p.571-591, 1993.

HOEPPNER, M.P.; LUNDQUIST, A.; PIRUN, M.; MEADOWS, J.R.; ZAMANI, N.; ET AL. An Improved Canine Genome and a Comprehensive Catalogue of Coding Genes and Non-Coding Transcripts. **PloS one**, v.9, n.3, p.e91172, 2014.

KATAYAMA, K.; NOMURA, S.; TRYGGVASON, K.; ITO, M. Searching for a treatment for Alport syndrome using mouse models. **World J. Nefrol.**, v.3, p.230-236, 2014.

KIRKNESS, E.F.; BAFNA, V.; HALPERN, A.L.; LEVY, S.; REMINGTON, K.; RUSCH, D.B.; DELCHER, A.L.; POP, M.; WANG, W.; FRASER, C.M.; VENTER, J.C. The dog genome: survey sequencing and comparative analysis. **Science**, v.301, p.1898-1903, 2003.

KNEBELMANN, B.; BREILLAT, C.; FORESTIER, L.; ARRONDEL, C.; JACASSIER, D.; GIATRAS, I.; DROUOT, L.; DESCHENES, G.; GRUNFELD, J.P.; BROYER, M.; GUBLER, M.C.; ANTIGNAC, C. Spectrum of Mutations in the COL4A5 Collagen Gene in X-Linked Alport Syndrome. **Am. J. Hum. Genet.**, v.59, p.1221-1232, 1996.

KOEMAN, J.P.; EZILIUS, J.W.; BIEWENGA, W.J.; VAN DEN BROM, W.E.; GRUYS, E. Familial nephropathy in cocker spaniels. **Dtsch. Tierarztl. Wochenschr.**, v.96, p.174–179, 1989.

KOMAROMY A.M., SMITH P.J.; BROOKS D.E. Electroretinography in dogs and cats. Part I. Retinal morphology and physiology. *Compend. Contin. Educ. Vet.*, v.20, p.343-354, 1998.

KOMAROMY, A.M.; PETERSEN-JONES, S.M. Genetics of canine primary glaucomas. **Vet. Clin. North. Am. Small Anim. Pract.**, v.45, p.1159-1182, 2015.

KROOK, L. The pathology of renal cortical hypoplasia in the dog. **Nord. Vet. Med.**, v.9, p. 161-176, 1957.

KUCHTEY, J.; OLSON, L.M.; RINKOSKI, T.; MACKAY, E.O.; IVERSON, T.M.; GELATT, K.N.; HAINES, J.L.; KUCHTEY, R.W. Mapping of the disease locus and identification of ADAMTS10 as a candidate gene in a canine model of primary open angle glaucoma. **PLoS one**, v.7, p.e1001306, 2011.

Laboklin. Disponível em: <http://www.laboklin.co.uk/laboklin/showGeneticTest.jsp?testID=8094P>> Acesso em 29 de janeiro de 2019.

LEES, G.E.; HELMAN, R.G.; HOMCO, L.D.; MILLICHAMP, N.J.; HUNTER, J.F.; FREY, M. Early diagnosis of familial nephropathy in English cocker spaniels. **J. Am. Anim. Hosp. Assoc.**, v.34, p.189-195, 1998a.

LEES, G.E.; HELMAN, R.G.; KASHTAN, C.E.; MICHAEL, A.F.; HOMCO, L.D.; MILLICHAMP, N.J.; NINOMIYA, Y.; SADO, Y.; NAITO, I.; KIM, Y. A model of autosomal recessive Alport syndrome in English cocker spaniel dogs. **Kidney Int.**, v.54, p.706-719, 1998b.

LEES, G.E. Kidney diseases caused by glomerular basement membrane type IV collagen defects in dogs. **J. Vet. Emerg. Crit. Care (San Antonio)**, v.23, p.184-193, 2013.

LEMMINK, H.H.; MOCHIZUKI, T.; VAN DEN HEUVEL, L.P.; SCHRÖDER, C.H.; BARRIENTOS, A.; MONNENS, L.A.; VAN OOST, B.A.; BRUNNER, H.G.; REEDERS, S.T.; SMEETS, H.J. Mutations in the type IV collagen alpha 3 (COL4A3) gene in autosomal recessive Alport syndrome. **Hum. Mol. Genet.**, v.3, p.1269-1273, 1994.

LLOYD, H.S. Cocker Spaniels. 1.ed. England: W&G Foyle, 1968.

MELLERSH, C.S. The genetics of eye disorders in the dog. **Canine Genet. Epidemiol.**, v.1, n.3, 2014.

MIYADERA, K.; ACLAND, G.M.; AGUIRRE, G.D. Genetic and phenotypic variations of inherited retinal diseases in dogs: the power of within- and across-breed studies. **Mamm. Genome**, v.23, n.0, p.40-61, 2012.

MCLELLAN, G.J.; ELKS, R.; LYBAERT, C.; WATTE, D.L.; MOORE, P.G. Vitamin E deficiency in dogs with retinal pigment epithelial dystrophy. **Vet. Rec.**, v.151, p.663-667, 2002

MCLELLAN, G.J.; CAPPELLO, R.; MAYHEW, I. G.; ELKS, R.; LYBAERT, P. et al. Clinical and pathological observations in English cocker spaniels with primary metabolic vitamin E deficiency and retinal pigment epithelial dystrophy. **Vet. Rec.**, v.153, p.287-292, 2003.

MOCHIZUKI, T.; LEMMINK, H.H.; MARIYAMA, M.; ANTIGNAC, C.; GUBLER, M.C.; PIRSON, Y.; VERELLEN-DUMOULIN, C.; CHAN, B.; SCHRÖDER, C.H.; SMEETS, H.J. Identification of mutations in the alpha 3(IV) and alpha 4(IV) collagen genes in autosomal recessive Alport syndrome. **Nat. Genet.**, v.8, p.77-81, 1994.

NOWEND, K. L.; STARR-MOSS, A. N.; LEES, G. E.; BERRIDGE, B. R.; CLUBB, F. J.; KASHTAN, C. E.; NABITY, M. B.; MURPHY, K. E. Characterization of the genetic basis for autosomal recessive hereditary nephropathy in the English Springer Spaniel. **J. Vet. Intern. Med.**, v.26, p.294-301, 2012.

Online Mendelian Inheritance in Animal database (OMIA). Disponível em: <<http://omia.org/home/>> Acesso em 15 de fevereiro de 2019.

Optigen. Disponível em: <http://www.optigen.com/opt9_test_prd_pra.html> Acesso em 29 de janeiro de 2019.

Orthopedic Foundation For Animals (OFA). Disponível em: <<https://www.ofa.org/diseases/breed-statistics?disease=AN>> Acesso em 29 de janeiro de 2019.

PARADIS, M.; DE JAHAM, C.; PAGÉ, N.; SAUVE, F.; HELIE, P. Acral mutilation and analgesia in 13 French spaniels. **Vet. Dermatol.**, v.16, p.87-93, 2005.

PARKER, H.G.; KIM, L.V.; SUTTER, N.B.; CARLSON, S.; LORENTZEN, T.D. et al. Genetic structure of the purebred domestic dog. **Science**, v.304, p.1160-1164, 2004.

PATTERSON, D.F. Companion animal medicine in the age of medical genetics. **J. Vet. Intern. Med.**, v.14, p.1-9, 2000.

PETERSEN-JONES, S. Advances in the molecular understanding of canine retinal diseases. **J. Small Anim. Pract.**, v.46, p.371-380, 2005.

PLASSAIS, J.; LAGOUTTE, L.; CORREARD, S.; PARADIS, M.; GUAGUÈRE, E.; HÉDAN, B. et al. A Point Mutation in a lincRNA Upstream of GDNF Is Associated to a Canine Insensitivity to Pain: A Spontaneous Model for Human Sensory Neuropathies. **PLoS one**, v.12, p.e1006482, 2016.

POTTER, J.S.; MCSPORRAN, K.D.; JAMES, M.P. Letter to the editor - a suspected case of familial nephropathy in the Cocker Spaniel. **N. Z. Vet. J.**, v.33, n.5, p.65-66, 1985.

REMEZ, L.; ZOBOR, D.; KOHL, S.; BEM-YOSEF, T. The progressive rod-cone degeneration (*PRCD*) protein is secreted through the conventional ER/Golgi-dependent pathway. **Exp. Eye Res.**, v.125, p.217-225, 2014.

ROBINSON, W.F.; HUXTABLE, C.R.; GOODING, J.P. Familial nephropathy in cocker spaniels. **Aust. Vet. J.**, v.62, p.109-112.

SAFATLE, A.M.V.; HVENEGAARD, A.P.; GOMES, D.; LEANDRO, D.C.; OTSUKI, D.; LISAK, R. Importância do eletrorretinograma de campo total (Full field ERG) em cães da raça Cocker Spaniel Inglês portadores de catarata. **Pesq. Vet. Bras.**, v.30, n.2, p.149-154, 2010a.

SLATTER, D. Fundamentos da oftalmologia veterinária. 3.ed. São Paulo: Roca, 2005. 686p.

SPENCER, W. J.; PEARRING, J.N.; SALINAS, R.Y.; LOISELLE, D.R.; SKIBA, N.P.; ARSHAVSKY, V.Y. Progressive Rod–Cone Degeneration (*PRCD*) Protein Requires N-Terminal S-Acylation and Rhodopsin Binding for Photoreceptor Outer Segment Localization and Maintaining Intracellular Stability. **Biochemistry**, v.55, p.5028-5037, 2016.

STEWART A.P.; MACDOUGALL D.F. Familial nephropathy in the Cocker Spaniel. **J Small Anim Pract**, v.25, p.15-24, 1984.

SUMMERS, J.F.; DIESEL, G.; ASHER, L.; MCGREEVY, P.D.; COLLINS, L.M. Inherited defects in pedigree dogs. Part 2: Disorders that are not related to breed standards. **The Vet. J.**, v.183, p.39-45, 2010.

The Cocker Spaniel Club (CSC). Disponível em <<http://www.thecockerspanielclub.co.uk/health.htm>> Acesso em 7 de setembro de 2018.

VILÀ, C.; SAVOLAINEN, P.; MALDONADO, J.E.; AMORIM, I.R.; RICE, J.E.; HONEYCUTT, R.L.; CRANDALL, K.A.; LUNDEBERG, J.; WAYNE, R.K. Multiple and ancient origins of the domestic dog. **Science**, v.276, p.1687-1689, 1997.

YOGO, T.; TERAOKA, K.; MURAKI, E.; HAMASAKA, Y.; FUJII, Y.; KUDO, S. et al. Clinical manifestation of canine blindness as presumed by PRA Japan (653 cases, 2005-2009). In: Annual Meeting of The American College Of Veterinary Ophthalmologists, 42., 2011, Hilton Head, SC, USA. **Abstracts. Hilton Head, SC ACVO**, p.3, 2011.

ZANGERL, B.; GOLDSTEIN, O.; PHILP, A.R.; LINDAUER, S.J.P.; PEARCE-KELLING, S.E.; MULLINS, R.F.; GRAPHODATSKY, A.S.; RIPOLL, D.; FELIX, J.S.; STONE, E.M.; ACLAND, G.M.; AGUIRRE, G.D. Identical mutation in a novel retinal gene causes progressive rod-cone degeneration in dogs and retinitis pigmentosa in humans. **Genomics**, v.88, p.551-563, 2006.

ZHENG, K.Q.; THORNER, P.S.; MARRANO, P.; BAUMAL, R.; MCINNIS, R.R. Canine X Chromosome-Linked Hereditary Nephritis - A Genetic Model for Human X-Linked Hereditary Nephritis Resulting from a Single Base Mutation in the Gene Encoding the alpha 5 Chain of Collagen Type IV. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America** v.91, p.3989-3993, 1994.

CAPÍTULO II

Trabalho redigido para submissão no periódico “Journal of Veterinary
Diagnostic Investigation”

Normas: [https://journals.sagepub.com/pb-
assets/cmscontent/VDI/JVDI%20Instructions%20to%20Authors.pdf](https://journals.sagepub.com/pb-assets/cmscontent/VDI/JVDI%20Instructions%20to%20Authors.pdf)

**Frequência alélica da mutação c.5G>A no gene *PRCD* responsável
pela Atrofia Progressiva da Retina em cães da raça Cocker Spaniel Inglês.**

(Allelic frequency of the mutation c.5G>A in the *PRCD* gene responsible
for progressive retinal atrophy in English Cocker Spaniel dogs.)

Resumo

A Atrofia Progressiva da Retina (PRA), causada pela mutação c.5G>A no gene da degeneração cone-bastonete progressiva (*PRCD*), se destaca entre as enfermidades hereditárias de origem genética que acometem cães da raça Cocker Spaniel Inglês (CSI). Até o momento a prevalência desta enfermidade não foi verificada no Brasil, sendo assim, o objetivo deste estudo foi avaliar a frequência alélica da mutação c.5G>A no gene. Para tanto, foram utilizados DNAs purificados de amostras sanguíneas ou de swab bucal de 220 cães da raça CSI, sendo 131 registrados na CBKC, provenientes de 17 canis diferentes e 89 sem histórico de registro. Foi realizada avaliação oftalmológica em 28 dos animais genotipados, dos quais 10 eram homozigotos afetados. Fragmentos do DNA, contendo a mutação, foram amplificados por PCR e submetidos ao sequenciamento gênico direto. A frequência alélica geral da mutação foi de 25,4%. No grupo de animais registrados pela CBKC a frequência alélica foi de 14,9%, já entre os animais sem histórico de registro a frequência foi de 41%. O déficit visual foi observado em 80% (8/10) dos animais homozigotos afetados que foram submetidos a avaliação oftalmológica. A alta frequência alélica encontrada neste estudo enfatiza a importância da realização dos testes de genotipagem nos cães da raça Cocker Spaniel Inglês como método de diagnóstico precoce não somente para serem feitas tentativas de melhoria da qualidade de vida dos cães afetados e seus tutores, mas também para a orientação dos acasalamentos visando a redução de casos clínicos da doença.

Palavras-chave: *prcd*-PRA, diagnóstico, doença genética, genotipagem,

Abstract

Progressive Retinal Atrophy (PRA) due to the mutation c.5G>A in the *PRCD* (Progressive Rod-Cone Degeneration) gene is an important genetic disease of English Cocker Spaniel (ECS) dogs. Since the prevalence of this disease haven't ever been verified in Brazil, this study aims to evaluate the allelic frequency of the mutation c.5G>A in the *PRCD* gene responsible for the *prcd*-PRA in ECS dogs. For that, purified DNA from blood samples or buccal swab of 220 English Cocker Spaniel dogs were used, of which 131 registered, from 17 different kennels and 89 without a history of registration. A clinical eye examination was performed in 28 of the genotyped animals, of which 10 were homozygous affected. DNA fragments with the mutation region were amplified by PCR and submitted to direct genomic sequencing. Some of the genetically tested animals were also submitted to ophthalmic evaluation. The *prcd*-PRA allelic frequency was 25.5%. Among the registered dogs the allelic frequency was 14.9%, whereas among the dogs with no history of registration, this frequency was 41%. The visual impairment was observed in 80% (8/10) of the affected homozygous animals that underwent clinical eye examination. The high number found in this study emphasizes the importance to perform the genotyping test in ECS as an early diagnostic test, not only for trying an improvement of the affected dogs' life quality but also for breeding orientation to avoid clinical cases of the disease.

Keywords: *prcd*-PRA, diagnosis, genetic disease, genotyping

Introdução

As doenças da retina em cães estão entre as mais frequentes e bem caracterizadas do grupo de doenças oculares hereditárias na espécie.⁷ O termo atrofia progressiva da retina (PRA) se refere ao conjunto de enfermidades genéticas encontradas em mais de 100 raças de cães, sendo conhecidas em torno de 20 mutações em 18 genes diferentes responsáveis pela PRA.^{4,9}

O início dos sinais clínicos e sua forma de progressão variam entre as raças afetadas.⁴ O diagnóstico clínico é observado no Cocker Spaniel Inglês entre 3 e 13 anos de idade.¹⁵ A doença é caracterizada clinicamente pela perda

da visão noturna (nictalopia), ocasionada pela morte dos bastonetes, que evolui gradativamente para a perda da visão diurna (hemeralopia), em consequência da morte dos cones, culminando em cegueira total bilateral.^{1,11} Alterações como hiperreflexia, alterações de pigmentação e vasculares, atrofia do nervo óptico são achados comuns no exame de fundo de olho bilateral na fase inicial da doença.^{4,12}

A PRA associada à degeneração de cone-bastonete progressiva (*prcd*-PRA), que acomete cães da raça Cocker Spaniel Inglês e de outras raças, como Poodle Miniatura, Cocker Spaniel Americano, Labrador Retriever,¹⁵ é uma doença hereditária autossômica recessiva ocasionada pela mutação c.5G>A no gene da degeneração cone-bastonete progressiva (*PRCD*). Esta mutação leva à troca de uma guanina por uma adenina (TGC>TAC), que resultará na substituição de uma cisteína por uma tirosina no momento da tradução.^{5,15} Uma vez que, a mesma mutação genética responsável pela *prcd*-PRA em cães causa a retinite pigmentosa ou retinose pigmentar em humanos, cães com esta mutação poderão servir como modelo experimental para o estudo da doença em humanos.¹⁵

Dados com relação a prevalência do alelo mutado são escassos na literatura mundial. Na República Tcheca, em 2011, foi observada a frequência alélica de 34% em cães da raça CSI.³ No Brasil, a avaliação desta frequência é inexistente. Embora exista estudo relatando casos clínicos de animais com PRA, o mesmo não traz o genótipo desses animais.¹³

O diagnóstico clínico da doença pode ser realizado por exames oftalmológicos de fundo de olho e pela eletrorretinografia.² Contudo, por se tratar de uma doença hereditária e de manifestação tardia, a detecção precoce da mutação em heterozigose ou homozigose por técnicas moleculares permite a adoção de medidas de orientação de acasalamentos, visando a redução do número de casos clínicos de *prcd*-PRA, sendo assim o objetivo deste estudo foi avaliar a frequência alélica da mutação c.5G>A no gene *PRCD* responsável pela Atrofia Progressiva da Retina (*prcd*-PRA) em cães da raça Cocker Spaniel Inglês.

Materiais e Métodos

Todos os procedimentos realizados nos animais deste estudo foram previamente aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da FMVZ, UNESP (Protocolo CEUA - 0218/2016).

Utilizando o software OpenEpi (versão online 3.01) e considerando o intervalo de confiança de 95%, o número de CSI registrados na Confederação Brasileira de Cinofilia (CBKC) nos últimos cinco anos (1.415 animais), e a frequência alélica da mutação c.5G>A descrita pelo English Cocker Spaniel Club of America (ECSCA) em 2017 de 12% (ecscachealthandrescue.org/2013-07-11-04-01-05/prcd-pra), obteve-se o número amostral de 146 cães da raça CSI. Entretanto, foram utilizados DNA de 220 CSI.

Dentre os 220 cães amostrados (69 machos e 151 fêmeas), 192 não apresentavam queixa de afecções oftálmicas; sendo 125 cães registrados na CBKC e 67 cães sem histórico de registro; enquanto que 28 amostras eram de animais com queixa de afecções oftálmicas; sendo seis registrados na CBKC e 22 sem histórico de registro. As amostras dos 131 cães registrados foram colhidas em canis e durante exposições. Estes cães eram provenientes de 17 canis filiados a CBCK. Já as amostras dos 89 cães sem histórico de registro foram colhidas em eventos da raça (30) ou pertenciam ao banco de material genético (59) do Laboratório de Biologia Molecular da Clínica Veterinária, sendo de cães atendidos no Hospital Veterinário da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da UNESP-Botucatu com diversas queixas clínicas.

Os 28 cães com queixa de afecções oftálmicas foram submetidos a avaliação oftálmica, contendo anamnese e exame oftálmico incluindo resposta de ameaça, reflexos pupilares e o exame de fundo de olho (fundoscopia), utilizando a ClearView™ Optical Imaging System (Optibrand®, USA). A fundoscopia somente foi realizada nos animais que apresentavam transparência em todos os meios. Adicionalmente, o exame de Eletroretinografia (ERG) foi realizado em um animal identificado como homozigoto afetado com o equipamento BPM-200 Retinographics (Retinographics inc, USA).

O DNA foi extraído de 144 amostras de sangue total e 76 amostras de swab bucal com o kit Illustra Blood GenomicPrep Mini Spin Kit (GE Healthcare). O DNA foi utilizado na PCR, para a amplificação do segmento alvo contendo o ponto da mutação no gene *PRCD*. Para isso, foram utilizados *primers* específicos¹⁴ (Forward CCAGTGGCAGCAGGAACC; Reverse CCGACCTGCTGCCCACGACTG). As reações foram padronizadas com um volume final de 25 µL utilizando 12,5 µL da enzima GoTaq® Green Master Mix (Promega™), 0,75 µL de cada primer, 8,5 µL de água livre de endonucleases e 2,5 µL do DNA. A termociclagem foi realizada nas seguintes condições: 95 °C por 5 min, seguida por 37 ciclos de 95 °C por 45s, 62 °C por 35s e 72 °C por 35s e extensão final de 72 °C por 5 minutos em termociclador (Mastercycler® ep gradient S - Eppendorf®, Hamburgo, Alemanha). Após a PCR, os produtos amplificados foram verificados por eletroforese em gel de agarose a 1,5%. Os produtos de PCR foram purificados com o Wizard® SV Gel e PCR Clean-Up System, Promega®, EUA, seguindo as recomendações do fabricante e submetidos ao sequenciamento direto automatizado, utilizando-se 10 µL do produto de PCR purificado e 5 µL do *primer forward*. As sequências e eletroferogramas obtidos foram alinhados para realização da genotipagem no software Sequencher™ (Gene Code Corporation).

Os resultados de genotipagem foram analisados e expostos de forma descritiva, possibilitando o estabelecimento de informações epidemiológicas, como a frequência alélica desta mutação no Brasil. Além disso, os dados de frequência alélica foram comparados entre machos e fêmeas, assim como entre animais registrados e sem histórico de registro (Teste Exato de Fisher), utilizando o GraphPad Prism® 5.01 software (GraphPad Software) e considerando $p < 0,05$.

Resultados

Os 220 animais analisados eram provenientes das regiões Sudeste (179/220), Nordeste (12/220), Centro-Oeste (26/220) e Sul (3/220). A idade dos

animais variou de quatro meses a 17 anos. A análise geral dos dados evidenciou que dentre os 220 animais, 130 (59%) eram *wild type*, ou seja, não apresentaram alelo com a mutação c.5G>A no gene *PRCD*, 68 (31%) eram heterozigotos, carregando a mutação em apenas um alelo e 22 (10%) eram homozigotos afetados, apresentando dois alelos mutados (Figura 1). Portanto, a frequência alélica da mutação foi de 25,5%. Não houve diferença estatística entre machos e fêmeas ($p = 0,5295$).

Quando se avaliou o genótipo dos 131 cães registrados na CBKC, observou-se a frequência alélica de 14,9%, sendo este grupo composto por: 72,5% (95/131) de cães N/N, 25,2% (33/131) de cães N/*prcd* e 2,3% (3/131) de cães *prcd/prcd*. Em 65% (11/17) dos canis amostrados foi encontrado ao menos um animal heterozigoto, além disso, todos os proprietários dos canis conheciam a doença, contudo apenas 29% (5/17) destes relataram já ter observado animais com a doença clínica em seu canil.

Entre os 89 cães sem registro na CBKC, 60,7% (54/89) apresentavam pelo menos um alelo mutado, sendo 39,3% (35/89) heterozigotos e 21,4% (19/89) homozigotos afetados, enquanto que, o genótipo N/N foi observado em 39,3% (35/89) dos animais deste grupo. Portanto, a frequência alélica da mutação no grupo de animais sem registro (41%) foi significativamente maior do que no grupo de animais registrados ($p < 0,0001$).

Cerca de 62% (119/192) dos animais sem queixa de distúrbio oftálmico apresentavam o genótipo *wild type*, enquanto que 32% (61/192) e 6% (12/192) dos cães eram heterozigotos ou homozigotos afetados, respectivamente. Entre os cães com queixa oftalmológica, 39% (11/28) eram *wild type*, 25% (7/28) eram heterozigotos e 36% (10/28) eram homozigotos afetados. A frequência alélica da mutação no grupo de animais sem alterações oftalmológicas foi de 22%, enquanto que no grupo dos animais com queixa de problemas oftálmicos esta frequência foi de 48%.

Os resultados da avaliação oftalmológica realizada em 28 animais com queixa de distúrbio oftálmico estão apresentados na tabelas1, no momento da

avaliação oftálmica a idade média destes animais era de 9,6 anos (variação de 3 a 15 anos). A visualização do fundo de olho não foi possível em 13 animais, que não apresentavam transparência em todos os meios devido a presença de catarata e/ou alterações como opacidade de córnea. Seis animais apresentaram as seguintes alterações de fundo de olho: atenuação de vasos (Figura 2), hiperreflexia, hiporreflexia e palidez de disco óptico, enquanto que nove animais apresentaram fundo de olho sem alteração (Figura 3). O ERG foi realizado em um animal afetado, de oito anos de idade e revelou ausência de resposta de bastonetes nos dois olhos, ausência de resposta de cones no olho direito e resposta diminuída de cones no olho esquerdo (Figuras 4, 5 e 6).

Discussão

Embora o número de registro por ano de CSI na CBKC tenha diminuído com passar do tempo, a raça ainda continua sendo bastante escolhida como cão de companhia, sendo a maior parte dos animais não registrados proveniente de criadores não profissionais. Uma vez que o número de CSI não registrado, bem como, a prevalência alélica da mutação no Brasil não foram determinados, o presente estudo utilizou para o cálculo amostral o número de animais registrado na CBKC, nos últimos cinco anos, e a prevalência alélica descrita pela ECSCA em 2017. Contudo, com o objetivo de otimizar o uso de amostras previamente colhidas e armazenadas no banco genético institucional optou-se em utilizar um número amostral maior.

Segundo o ECSCA, utilizando dados oriundos de um laboratório de diagnóstico molecular, a frequência alélica mundial da mutação c.5G>A nos anos de 1999 e 2017 foi de aproximadamente 44% e 12%, respectivamente (ecscachealthandrescue.org/2013-07-11-04-01-05/prcd-pra). Ainda segundo estes dados, a redução da frequência alélica ocorreu de forma mais vertiginosa a partir do ano de 2012, quando caiu de cerca 25% naquele ano para 12% em 2017, que deve estar associada a uma maior utilização dos testes genéticos por

parte dos criadores e consequente seleção de acasalamentos de acordo com o genótipo dos animais.

De acordo com o genótipo de 3.403 CSI registrados no *The Kennel Club* (<https://www.thekennelclub.org.uk/health/for-breeders/dna-screening-schemes-and-results/dna-screening-for-breeds-s-z/spaniel-cocker-dna-screening/>), a frequência alélica para a mutação no Reino Unido em janeiro de 2019 era de 15,1%. Embora os dados dessas associações não tenham sido publicados em periódicos e estudos científicos avaliando a frequência alélica da *prcd*-PRA em cães da raça CSI, sendo extremamente escassos, em 2011, a frequência alélica da *prcd*-PRA no CSI era de 34% na República Tcheca,³ frequência similar àquela encontrada no mesmo ano pela ECSCA.

No presente estudo, a frequência alélica geral foi de 25,5%, contudo, essa frequência cai para 14,9% no grupo de animais registrados na CBKC, ao contrário, no grupo de animais sem registro a frequência alélica sobe para 41%. Embora não existam estudos prévios no Brasil que permitam comparar a frequência alélica de anos anteriores, os resultados encontrados no presente estudo no grupo dos animais registrados na CBKC assemelham-se as taxas encontradas na ECSCA e no *The Kennel Club* (UK). Diferentemente do que ocorre nestas associações, a CBKC não mantém uma lista de animais e seus respectivos genótipos disponível, o que poderia auxiliar os acasalamentos visando a redução da frequência alélica da mutação. Apesar disso, a frequência alélica observada em animais registrados na CBKC foi semelhante àquelas encontradas nestas duas associações, o que pode ser reflexo do conhecimento da enfermidade e da seleção dos acasalamentos de acordo com o genótipo dos animais por parte dos criadores filiados. Por outro lado, a maior frequência alélica encontrada no grupo de animais sem registro, que comparado ao grupo dos registrados apresentou diferença estatística ($p < 0,0001$), sugere que criadores não filiados, no Brasil, desconhecem a importância da enfermidade no CSI e realizem acasalamentos de forma indiscriminada, com o total desconhecimentos dos genótipos dos cães.

Embora, animais heterozigotos ou afetados tenham sido identificados em 65% (11/17) dos canis filiados a CBKC avaliados no presente estudo, apenas 29% (5/17) dos criadores responsáveis por estes canis relataram já ter observado animais com a doença clínica. Esse valor pode ser devido ao fato dos cães de canil permanecerem em baias no período noturno, dificultando a observação da nictalopia, além de que, estes animais são habituados a esses ambientes, não demonstrando déficits visuais. Outra possibilidade seria a de que grande parte dos cães utilizados na reprodução não permanecem toda a sua vida nos canis, sendo doados após determinada quantidade de crias, com idade as vezes insuficiente para manifestarem a doença.

A *prcd*-PRA, uma importante causa de cegueira, é uma das doenças oftálmicas com alta predisposição no CSI.⁸ Isto foi observado no presente estudo, uma vez que entre os cães que apresentavam queixa de afecções oftálmicas a frequência alélica da mutação foi de 48%, enquanto que entre os cães que não apresentavam tal queixa, esta frequência foi de 22%. As demais alterações oftálmicas realizada nos animais *wild type* (n=10) e heterozigotos (n=7) para a *prcd*-PRA corroboram com outros estudos, que consideram o CSI entre as raças que comumente apresentam outras doenças oculares, além da *prcd*-PRA.⁸

Dos dez homozigotos afetados para *prcd*-PRA, submetidos a avaliação oftálmica, oito apresentaram déficit visual, que segundo os proprietários, foi observado entre cinco e 14 anos de idade. O reflexo pupilar a luz em animais com *prcd*-PRA diminui lentamente conforme a progressão da doença, podendo inclusive ainda estar presente em animais com a doença em estágios avançados.⁹ No presente estudo este sinal clínico estava diminuído ou ausente em quatro animais homozigotos afetados. A catarata é um distúrbio secundário comum em animais com PRA, podendo ser diagnosticada no CSI ainda em estágios iniciais da doença.¹⁰ Em estudo prévio observou-se que 90% dos CSI com catarata e diminuição da acuidade visual também apresentaram PRA.¹³ Corroborando com estes autores,¹³ no presente estudo a presença de catarata foi observada na maioria (7/10) dos animais com *prcd*-PRA submetidos ao

exame oftálmico e impossibilitou a visualização do fundo de olho em quatro desses animais.

Entre as principais alterações observadas no exame de fundoscopia dos quatro animais homozigotos afetados, a atenuação de vasos retinianos (4/4) (Figura 2) e a hiperreflexia (2/4) podem ser observadas no curso inicial da doença, enquanto que a hiporreflexia (2/4) e palidez do disco óptico (2/4) são observadas conforme a doença progride.^{4,9,13} Estas alterações, sugestivas de *prcd*-PRA, foram visualizadas no presente estudo em animais com idades variando entre oito e 14 anos corroboram com outros autores.¹⁵ Assim como ocorreu em dois cães homozigotos afetados no presente estudo, o exame fundoscopia pode estar inalterado em animais com *prcd*-PRA em estágios iniciais.^{6,9,13} Além disso, as alterações de retina, evidenciadas no exame de fundoscopia de uma cão *wild type* e um outro heterozigoto podem ser decorrentes de outras enfermidades, e.g., inflamatórias ou infecciosas, tóxicas, vasculares.⁹

No presente estudo, a visualização do fundo de olho não foi possível em cerca da metade dos animais submetidos ao exame oftalmológico (13/27), independentemente do genótipo destes animais, devido a afecções não somente como catarata, mas também ceratoconjuntivite seca (CCS), uveíte e glaucoma, que podem diminuir a transparência dos meios, impossibilitando a avaliação da retina, o que reforça a importância de outros exames complementares, além da fundoscopia, para o diagnóstico clínico da PRA.

O ERG, que avalia a função da retina, realizado no presente estudo em apenas um animal homozigoto afetado, de oito anos de idade, revelou ausência de resposta de bastonetes nos dois olhos, ausência de resposta de cones no olho direito e resposta diminuída de cones no olho esquerdo. Enquanto que a fundoscopia deste animal havia apresentado apenas atenuação de vasos retinianos. Portanto, o ERG confirmou a enfermidade clínica no animal deste estudo e confirmou o seu uso como ferramenta diagnóstica mais sensível que a fundoscopia,^{6,9,13} uma vez que este exame pode estar alterado mesmo nas fases iniciais da doença, quando ainda não são visualizadas alterações na

fundoscopia.^{6,9,13} O custo deste exame pode torná-lo inacessível a maioria dos proprietários, além disso, a necessidade de submeter os animais à sedação e/ou à anestesia geral para realização do exame pode representar um risco a animais idosos e não ser autorizado pelos proprietários. Estas condições inviabilizaram o uso deste exame nos demais animais submetidos ao exame oftalmológico no presente estudo.

Além do ERG, nos casos em que outras afecções impossibilitam a avaliação da retina pela fundoscopia, outro teste eletrodiagnóstico que poderia ser aplicado seria o potencial evocado visual, que auxilia na determinação da localização, distribuição, gravidade e extensão das lesões relacionadas com a via visual, podendo ser uma forma de diagnosticar lesões de nervo óptico,¹⁴ porém infelizmente, no presente estudo, este exame não estava disponível.

Uma vez que a PRA é uma doença que se manifesta tardiamente e possui progressão geralmente lenta, poucos animais passam por avaliação oftálmica até apresentarem o primeiro sinal clínico. Contudo, o diagnóstico etiológico de *prcd*-PRA não é alcançado apenas pelo exame oftalmológico, sendo a realização da genotipagem necessária para tanto. Este estudo foi capaz de estabelecer a situação desta doença genética em cães da raça CSI no Brasil e tendo em vista a escassez de dados com relação a sua prevalência na literatura mundial, demonstrou uma alta frequência alélica da mutação a ela associada, enfatizando a importância dos testes de genotipagem como método de diagnóstico precoce não somente para melhorar a qualidade de vida dos cães afetados e de seus tutores, mas também para a orientação dos acasalamentos visando a redução de casos clínicos da doença.

Referências

1. Aguirre-Hernández J, et al. The Finnish lapphund retinal atrophy locus maps to the centromeric region of CFA9. BMC Vet Res 2007;3:14.
2. Dave U, Dave CJ. Involvement of PRCD and RPGR Genes in Progressive Retinal Atrophy in Locally Bred Canines. J Mol Biomark Diagn 2014;5:1.
3. Dostal J, et al. Progressive rod-cone degeneration (PRCD) in selected dog breeds and variability in its phenotypic expression. Vet Med (Praha) 2011;56:243-247.
4. Downs LM, et al. Genetic screening for PRA-associated mutations in multiple dog breeds shows that PRA is heterogeneous within and between breeds. Vet Ophthalmol 2014;17:126-130.
5. Gentilini F, et al. Real-Time Detection of the Mutation Responsible for Progressive Rod-Cone Degeneration in Labrador Retriever Dogs Using Locked Nucleic Acid TaqMan Probes. J Vet Diagn Invest 2009;21:689-692.
6. Komaromy AM, et al. Electroretinography in dogs and cats. Part I. Retinal morphology and physiology. Compend Contin Educ Vet 1998;20:343-354.
7. Mellersh CS. The genetics of eye disorders in the dog. Canine Genet and Epidemiol 2014;1(3).
8. Miller PE. Breed predisposition to eye disorders. In: Maggs DJ, Miller PE, Ofri R, ed. Slatter's Fundamentals of Veterinary Ophthalmology. 5th ed. USA: Saunders, 2012.
9. Miyadera K, et al. Genetic and phenotypic variations of inherited retinal diseases in dogs: the power of within- and across- breed studies. Mamm Genome 2012;23:40-61.

10. Narfström K, Petersen-Jones SM. Diseases of the Canine Ocular Fundus. In: Gelatt KN, Gilger BC, Kern TJ, ed. *Veterinary Ophthalmology*. 5th ed. Vol. 2. USA: Lippincott Williams and Wilkins, 2013:1303-1392.
11. Patterson DF. Companion animal medicine in the age of medical genetics. *J Vet Intern Med* 2000;14:1-9.
12. Petersen-Jones S. Advances in the molecular understanding of canine retinal diseases. *J Small Anim Pract* 2005;46:371-380.
13. Safatle AMV, et al. Importância do eletrorretinograma de campo total (Full field ERG) em cães da raça Cocker Spaniel Inglês portadores de catarata [Full field electroretinogram in English Cocker Spaniels presenting cataracts]. *Pesq Vet Bras* 2012;30:149-154. Portuguese.
14. Torres D, et al. Clinical Guideline for Assessing Flash Visual Evoked Potentials in Laboratory Dogs and Normal Data for Beagle Dogs. *Scand J Lab Anim Sci* 2016;42.
15. Zangerl B, et al. Identical mutation in a novel retinal gene causes progressive rod–cone degeneration in dogs and retinitis pigmentosa in humans. *Genomics* 2006;88:551-563.

Tabelas

Tabela 1. Resultados da avaliação oftálmica dos 28 Cocker Spaniel Inglês com queixa de alterações oftálmicas de acordo com o seu genótipo.

		Wild Type (n=11)	Heterozigoto (n=7)	Afetado (n=10)
Déficit visual	Presente	2 (18%)	1 (14%)	8 (80%)
	Ausente	9 (82%)	6 (86%)	2 (20%)
Reflexo pupilar a luz	Presente	7 (64%)	4 (57%)	6 (60%)
	Diminuído	0	2 (29%)	2 (20%)
	Ausente	1 (9%)	1 (14%)	2 (20%)
	Não visualizado*	3 (27%)	0	0
Catarata	Presente	0	3 (43%)	7 (70%)
	Ausente	8 (73%)	4 (57%)	3 (30%)
	Não visualizado*	3 (27%)	0	0
Fundoscopia	Com alterações	1 (9%)	1 (14%)	4 (40%)
	Sem alterações	6 (55%)	1 (14%)	2 (20%)
	Não visualizado*	4 (36%)	5 (71%)	4 (40%)

* Não visualizado devido a pigmentação ou opacidade corneana ou catarata

Legendas das figuras

- FIGURA 1 -** Eletroferograma de três cães da raça Cocker Spaniel Inglês.
- FIGURA 2 -** Imagens de fundoscopia obtida com o ClearView™ Optical Imaging System (Optibrand®, USA) de dois cães da raça Cocker Spaniel Inglês. Observa-se a atenuação dos vasos retinianos no olho esquerdo (A) e direito (B) de um cão homozigoto recessivo para *prcd*-PRA, enquanto que os vasos retinianos do olho esquerdo (C) e direito (D) de um cão *wild type* para *prcd*-PRA apresenta-se normais.
- FIGURA 3 -** Representação gráfica da resposta de bastonetes do eletrorretinograma de cão homozigoto afetado, da raça Cocker Spaniel Inglês, 8 anos de idade. Exame realizado com Sistema Eletrorretinográfico BPM 200.
- FIGURA 4 -** Representação gráfica da resposta de cones do eletrorretinograma de cão homozigoto afetado, da raça Cocker Spaniel Inglês, 8 anos de idade. Exame realizado com Sistema Eletrorretinográfico BPM 200.
- FIGURA 5 -** Representação gráfica da máxima resposta de cones do eletrorretinograma de cão homozigoto afetado, da raça Cocker Spaniel Inglês. Exame realizado com Sistema Eletrorretinográfico BPM 200.

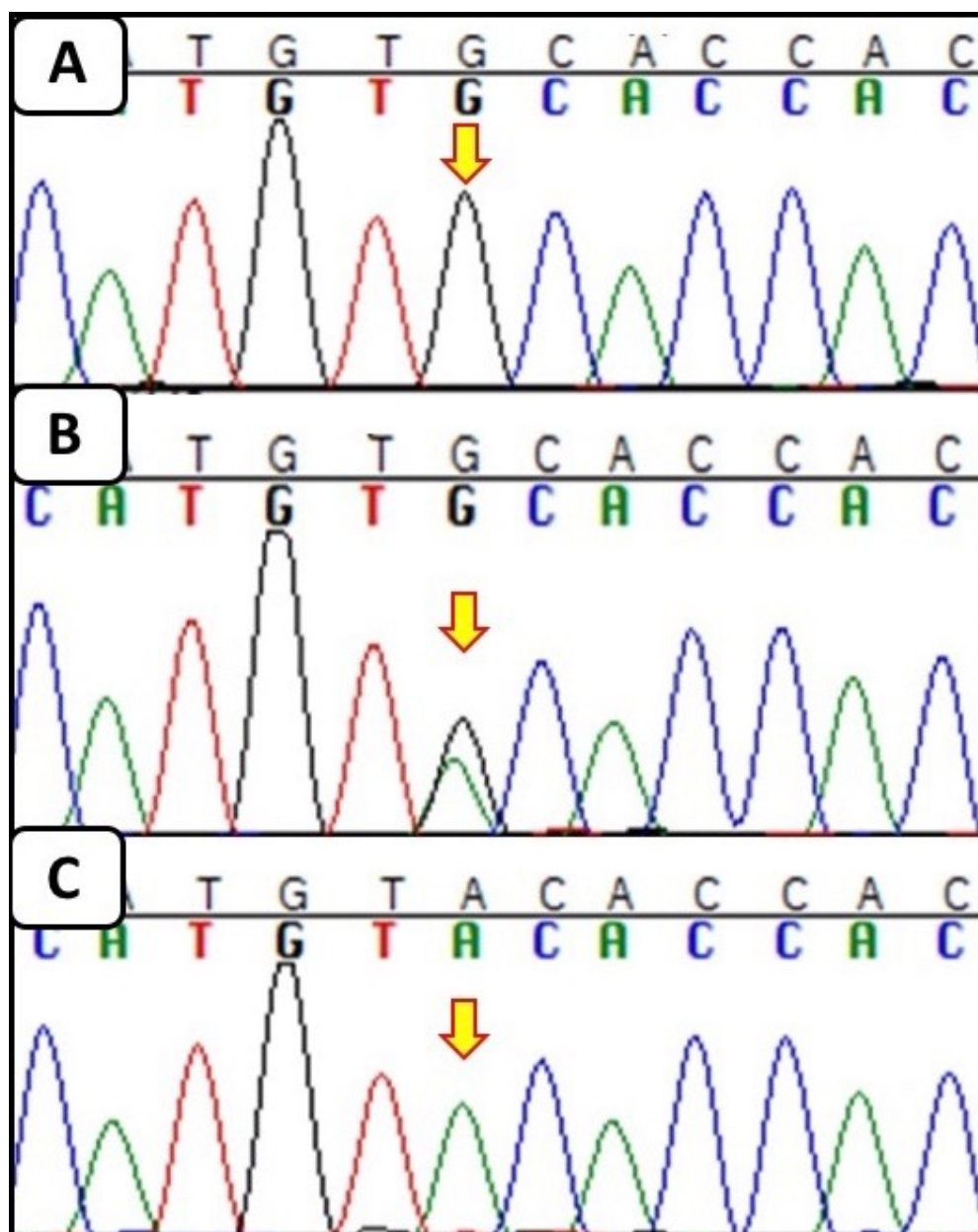


Figura 1 – Eletroferogramas de três cães da raça Cocker Spaniel Inglês: A, *Wild type* (G/G); B, Heterozigoto (G/A); e C, Homozigoto afetado (A/A). As setas amarelas localizam os pontos da mutação em cada uma das sequências.

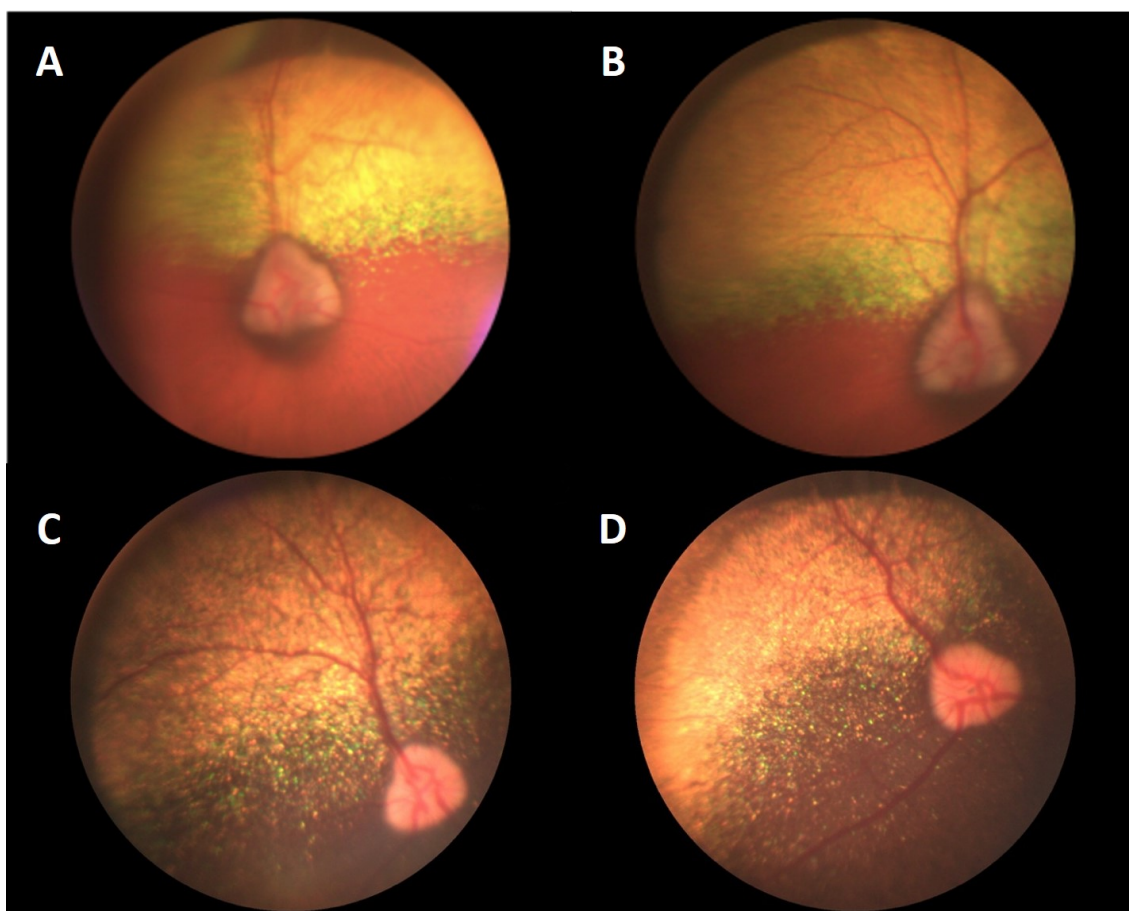


Figura 2 – Imagens de fundoscopia obtida com o ClearView™ Optical Imaging System (Optibrand®, USA) de dois cães da raça Cocker Spaniel Inglês. Observa-se a atenuação dos vasos retinianos no olho esquerdo (A) e direito (B) de um cão homozigoto recessivo para *prcd*-PRA, enquanto que os vasos retinianos do olho esquerdo (C) e direito (D) de um cão *wild type* para *prcd*-PRA apresenta-se normais.

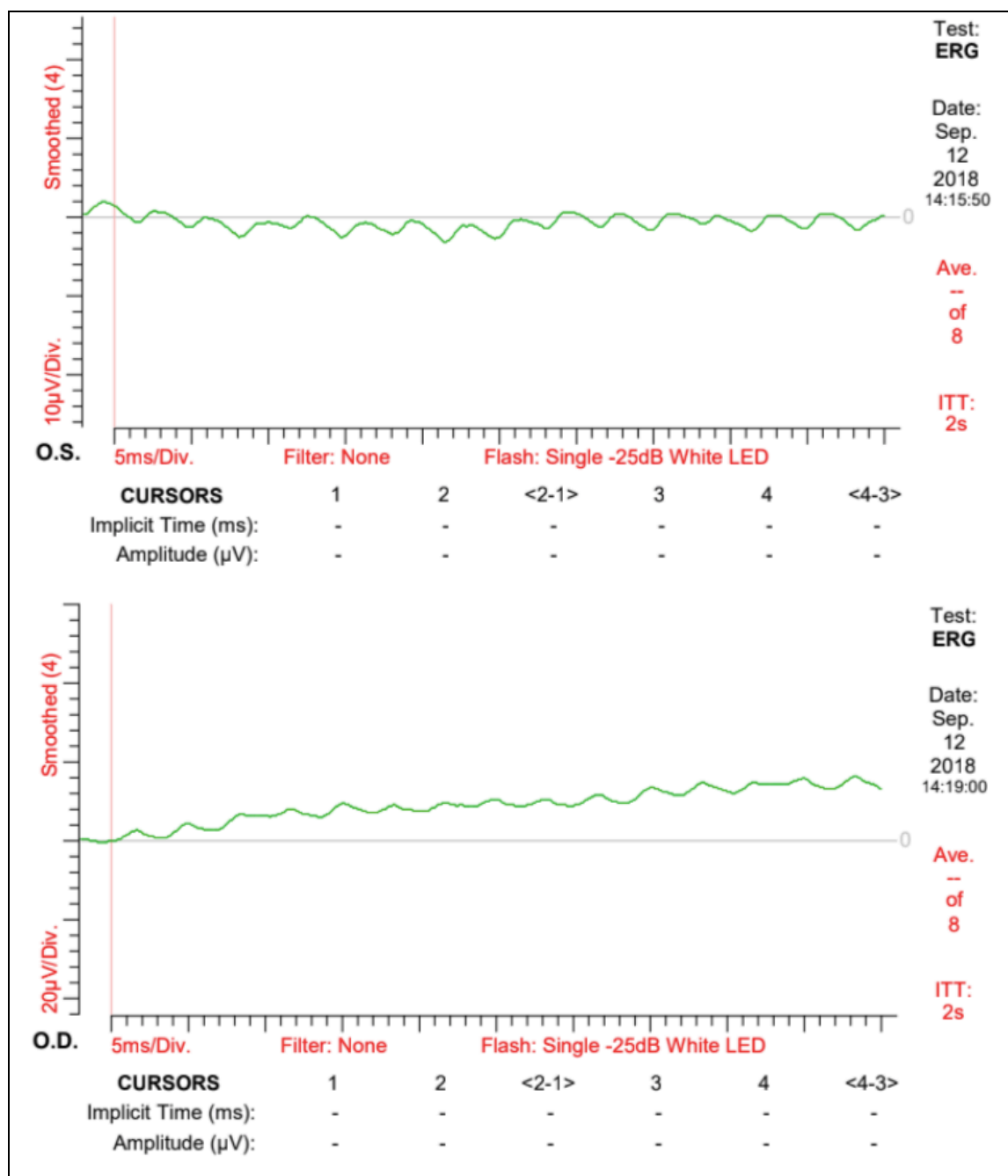


Figura 3 – Representação gráfica da resposta de bastonetes do eletroretinograma de cão homozigoto afetado, da raça Cocker Spaniel Inglês, 8 anos de idade. Exame realizado com Sistema Eletroretinográfico BPM 200.

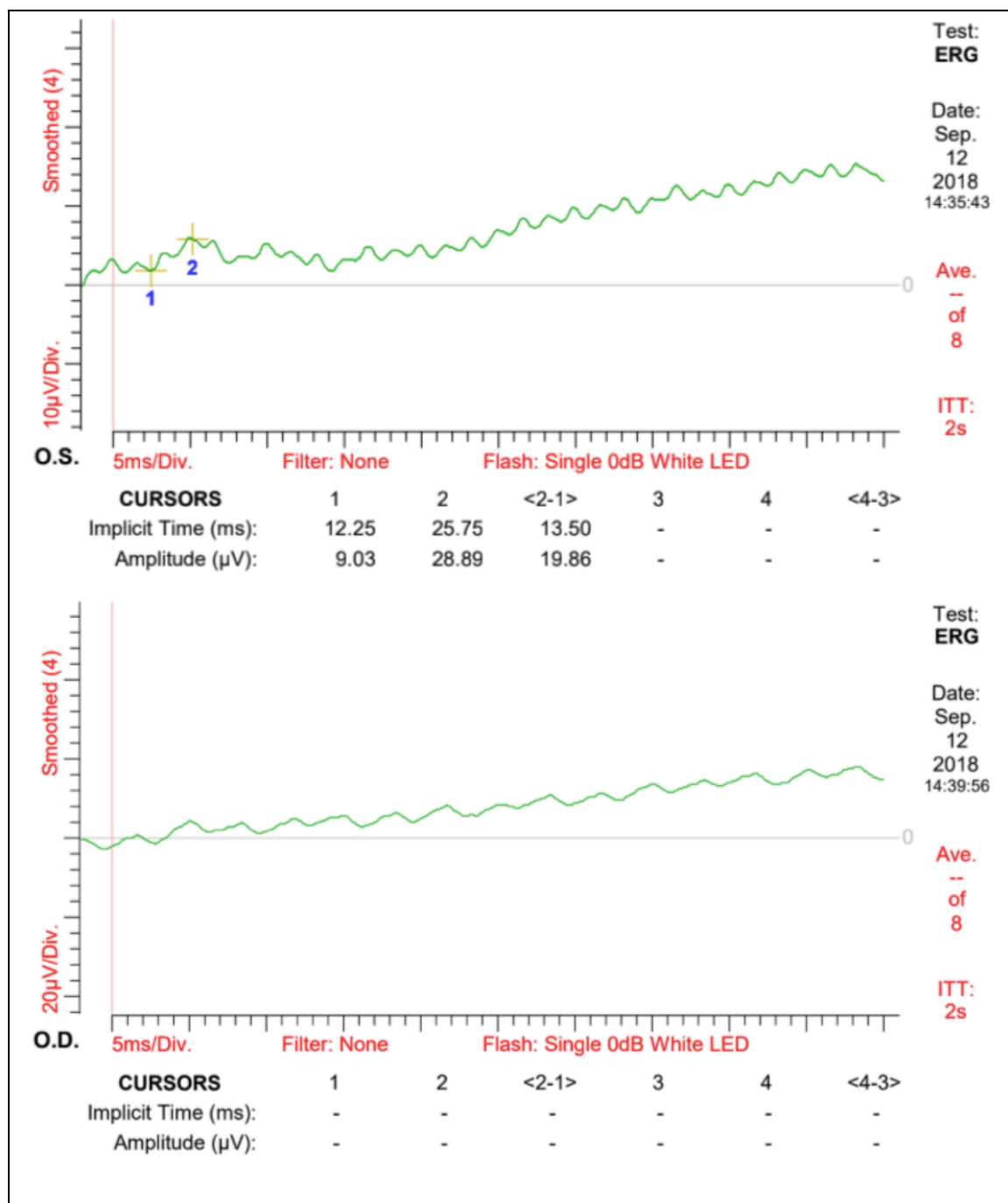


Figura 4 – Representação gráfica da resposta de cones do eletroretinograma de cão homozigoto afetado, da raça Cocker Spaniel Inglês, 8 anos de idade. Exame realizado com Sistema Eletroretinográfico BPM 200.

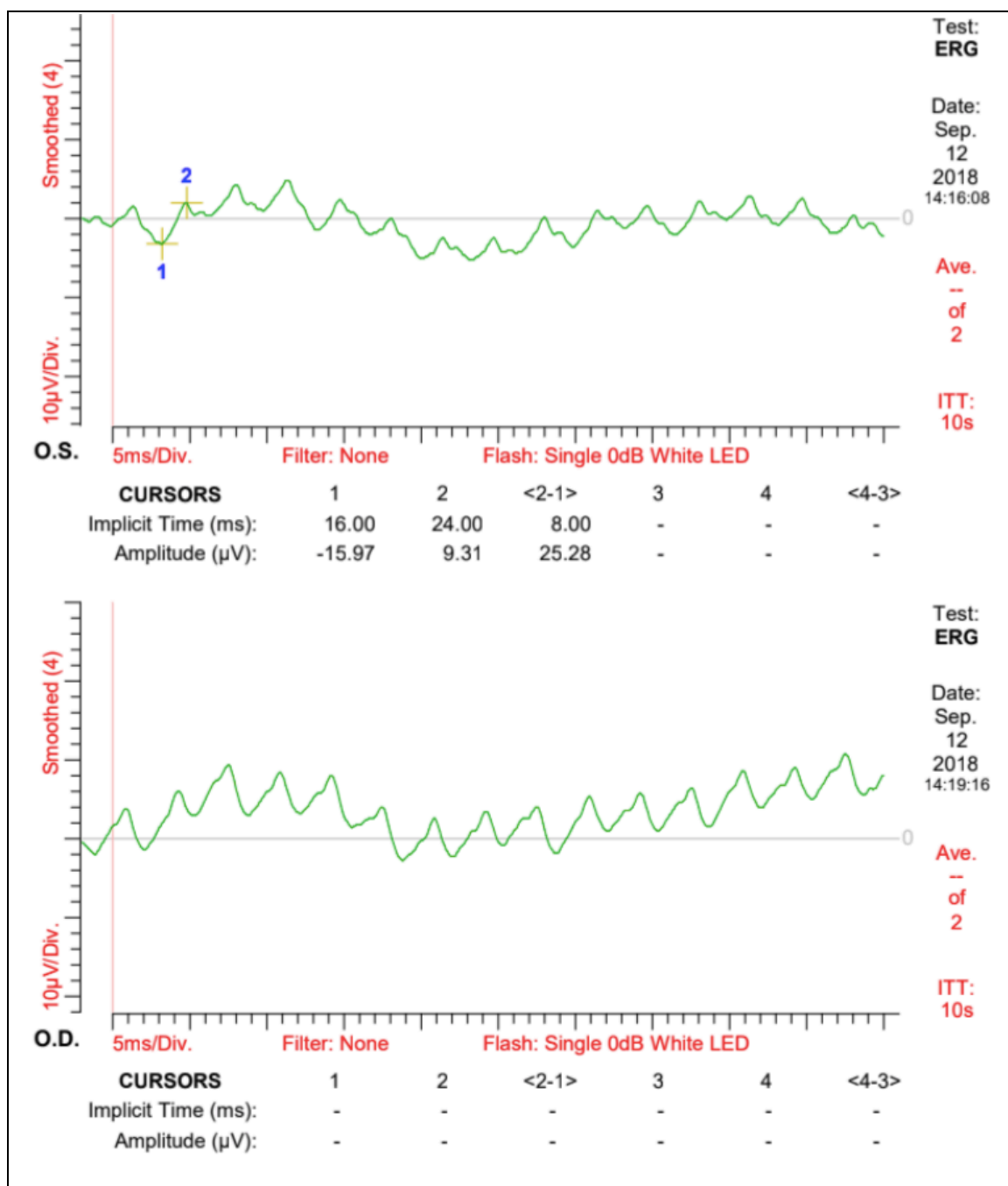


Figura 5 – Representação gráfica da máxima resposta de cones do eletrorretinograma de cão homozigoto afetado, da raça Cocker Spaniel Inglês. Exame realizado com Sistema Eletrorretinográfico BPM 200.

Normas de submissão: Instruções aos autores – JVDI, disponível em: <https://journals.sagepub.com/pb-assets/cmscontent/VDI/JVDI%20Instructions%20to%20Authors.pdf>

1. Scope and editorial policy

The *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* (J Vet Diagn Invest) is an international peer-reviewed journal published in English as the official journal of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians (AAVLD). JVDI is devoted to all aspects of veterinary laboratory medicine. The major disciplines are anatomic pathology, bacteriology/mycology, clinical pathology, epidemiology, immunology, laboratory information management, molecular biology, parasitology, public health, toxicology, and virology.

Three manuscript formats are accepted for review: **Review Articles**, **Full Scientific Reports**, and **Brief Communications**. Review articles are strongly encouraged provided they cover subjects of current and broad interest to veterinary laboratory diagnosticians. The suitability of **Letters to the Editor**, **Book Reviews**, and **Commentaries** is determined by the Editor-in-Chief, and a pre-submission inquiry to the editor is recommended.

1.1 Copyright considerations

JVDI accepts original manuscripts for consideration with the understanding that the same material or a substantial part thereof is not presently being considered for publication or has not been published elsewhere. The Corresponding Author must secure the approval of all authors and institution(s) where the work was carried out. A statement to the Editor confirming that such approval has been received must be included in the submission cover letter. Upon acceptance for publication, authors will receive a link to the **Contributor Form** to transfer copyright or other suitable arrangement to the publisher. All articles published in JVDI are protected by copyright that covers the translation rights as well as the exclusive rights of AAVLD to reproduce and distribute the

articles. JVDI will not publish any manuscript for which the signed Contributor Form has not been submitted.

If your manuscript incorporates any previously copyrighted material not in the public domain, you must obtain written reprint permission from the copyright owner and submit a scanned PDF of the permission along with your manuscript files via our online manuscript submission portal (see section 8). No manuscript containing previously copyrighted material will be accepted for review in JVDI without submission of satisfactory proof that copyright permission has been obtained.

1.2 Ethical considerations

1.2.1 Animal welfare

JVDI requires that authors obtain the relevant national/state/institutional approval prior to animal experimentation. In the United States, this means the Institutional Animal Care and Use Committee for approval for any animal experiment.

Authors are encouraged to register their clinical trials at <http://clinicaltrials.gov> or other suitable databases identified by the International Committee of Medical Journal Editors.

1.2.2 Plagiarism

JVDI employs the software program iThenticate to detect plagiarism. From the U.S. Office of Research Integrity, plagiarism of text is “copying a portion of text from another source without giving credit to its author and without enclosing the borrowed text in quotation marks” and plagiarism of ideas is “appropriating someone else’s idea (e.g., an explanation, a theory, a conclusion, a hypothesis, a metaphor) in whole or in part, or with superficial modifications without giving credit to its originator.” **Detection of plagiarized material in any manuscript will result in its immediate rejection, regardless of its scientific merit.** The author’s institution may be notified.

1.3 Authors' contributions

The submitting author affirms that all individuals listed as authors agree that they have met the criteria of authorship and agree to the conclusions of the study. The JVDI Authorship Form is a downloadable PDF that must be completed and submitted during the submission process. For more information, see the International Committee of Medical Journal Editors on the roles and responsibilities of authors and contributors.

1.4 Equal credit for authorship

On the title page, use an asterisk (*) next to author names to indicate if authors should receive equal credit. Below the corresponding author information, add the following text: *These authors contributed equally to this work. (See section 4.2.1 for example.)

2. Fees

There is a manuscript-processing fee of \$75 for each printed page published in JVDI. This fee includes 2 free pages of color figures in print and online. Authors are responsible for paying the cost of publishing additional color pages at the rate of \$250 per page. Black & white images do not incur any additional cost. If and when the manuscript has been accepted, invoices for page and color charges will be sent via email to the Corresponding Author, and payment is expected WITHIN 30 DAYS.

3. Review and acceptance criteria

Based on assessment by the JVDI editorial office of compliance with JVDI acceptability criteria, manuscripts will be reviewed by 2 or more persons selected by the Editors on the basis of their expert knowledge and/or experience in the subject matter. Authors may provide the editorial staff with a list of suggested reviewers for their work, and may also request that specific individuals be excluded as reviewers in view of potential conflict of interest. The peer review process is single blinded, that is, editors and reviewers are aware of the authors'

identities, but authors are not informed of the reviewers' identities. Acceptance of a manuscript for publication is determined by the Editors based on peer review, scientific merit, and value to JVDI readers.

Potential reviewers of all manuscripts submitted to JVDI are asked to consider any potential conflicts of interest they may have before agreeing to review a manuscript. We expect that reviewers with a substantial conflict of interest will disqualify themselves from reviewing a manuscript. More information, as well as general Instructions to Reviewers, are available from SAGE.

Review and acceptability criteria include, but are not limited to, the following: novelty/usefulness and adequacy of experimental design, tables, and figures.

3.1 Novelty of contents and impact/usefulness to veterinary laboratory diagnosticians

3.1.1 Novelty

JVDI is devoted to the publication of **original** work. Before submitting a manuscript for review, it is the responsibility of all authors to review the literature to ensure that work similar to their own has not been published previously. Authors please take note of the following examples:

- The development of detection assays (notably PCR procedures) for pathogens that have existing assays already published in the literature: JVDI will consider these papers if it can be demonstrated that the submitted manuscript constitutes a significant improvement over previously published methodology. Please note that if one or more previously described PCR procedures for any given pathogen exist, subsequent submissions will be acceptable for publication only if the authors demonstrate equivalency (or preferably superiority) via a side-by-side comparison between the existing assay and the new assay. The manuscript must also assess important test-related criteria such as sensitivity, specificity, accuracy, robustness, rapidity, throughput, and cost.

- The isolation and/or identification of infectious agents from host species that have previously been described in the literature will be considered if the submitted paper adds impactful new information, such as a new detection method, novel virulence or pathogenicity data, or unique antimicrobial susceptibility information. In contrast, the detection of a well-known pathogen in a new animal species is not considered sufficiently novel information to warrant publication.

Single case reports will be considered for publication only if they demonstrate excellence in the diagnostic investigation, including a detailed discussion on the differential diagnosis. Preferred submissions would be novel, emerging, or unique case reports; case series summaries; classic diseases that have significantly evolved or changed in some fashion; or demonstration of the usefulness of new technologies to the diagnostic process. Case reports combined with a review of the literature on the topic of the case report may increase the chances of having a manuscript accepted for publication.

3.1.2 Usefulness and impact

The target readership of JVDI is veterinary laboratory diagnosticians. The contents of manuscripts published in JVDI must be applied science and relevant to the professional activities of this core group. Examples of manuscripts that do not fit within the scope of JVDI include the following:

- Clinically oriented manuscripts regarding therapy and clinical diagnostic techniques (e.g., ultrasonography, radiology).
- Basic science manuscripts (e.g., mapping genes of infectious agents without a practical diagnostic application).

3.2 Adequacy of experimental design and test validation

The experimental design used must be appropriate and adequate. Similarly, the interpretations and conclusions must be valid and supported by appropriate statistical analysis.

All tests used are expected to have been validated in-house. Variants of standard tests may be referenced to a previous peer-reviewed report. For PCR, primers and probes should be detailed. No reference needed for standard techniques, such as tissue sectioning and H&E staining. For more information, see current ASVCP Guidelines to quality assurance for point-of-care testing.

3.3 Adequacy of title, references, figures, and tables

The title must adequately reflect the contents of the manuscript. References must be as current and complete as possible, but avoid the use of multiple references to back up a single fact. Figures and tables must be pertinent to the contents of the manuscript and must not be redundant with information already presented in the text.

4. Manuscript preparation

- Microsoft Word file, double-spaced, 12-point Times New Roman font, left-justified, 25 mm (1 in.) margin on all sides, pages numbered at the bottom center (i.e., Page X of Y).
- For styles, do not use Heading 1, etc. Use the Normal style setting.
- Number the text lines consecutively throughout the manuscript; begin page 1 with line #1; do not restart numbering on each subsequent page.
- Indent paragraphs and do not include spaces between paragraphs.
- Allow 1 space (not 2) after a word or period.
- JVDI number style is one, 2, 3, 4... within the text, but 1, 2, 3, 4... when in a series in the same sentence.
- Number cases starting with case 1 regardless of your particular numbering system and use in all sections of the manuscript (e.g., cases 1–10; cases 2, 3, and 5). Laboratory case numbers should not be used in text, tables, or figures.
- Include tables in the main document, but do not embed figures. Supplementary tables should be submitted as a separate file.
- SI units of measurement (International System of Units) must be used (may include conventional units in brackets).

- For anatomic terms, use the English equivalents of terms in *Nomina Anatomica Veterinaria*. Names of infectious agents should follow the current published standards for viruses (ICTV, International Committee on Taxonomy of Viruses), bacteria (NCBI), and fungi (NCBI).
- In-text citations are listed in superscript after the punctuation as shown.^{1,2-4,8}
- Arrange references alphabetically, numbered consecutively.
- Submit figures in .tiff or .jpg formats only (see section 5).
- Submit supplementary tables as Microsoft Word files (see section 6). Submit supplementary figures following the figure guidelines (see section 5).

4.1 General format and style

4.1.1 Layout and media

Three manuscript formats are accepted: **Review Articles**, **Full Scientific Reports**, and **Brief Communications**. Review Articles are strongly encouraged provided they cover subjects of current and broad interest to veterinary laboratory diagnosticians. Authors interested in submitting a Review Article should contact the Editor-in-Chief (gmaxie@uoguelph.ca). The suitability of **Letters to the Editor**, **Book Reviews**, and **Commentaries** is determined by the Editor-in-Chief, and a pre-submission inquiry to the editor is recommended. Book Reviews are also welcome and should be emailed to Donal O'Toole, the Book Review Editor (DOT@uwo.edu), and not submitted through the submission site.

4.1.2 Language and style

The American form of English must be used, and manuscripts must be written in a style following the current standards for scientific publications. Editors will reject manuscripts that do not meet a minimum standard for written English. Abbreviations may be used after first mention with complete spelling. Use Arabic numerals except when a number begins a sentence, in which case spell the number out in full. An editing service, including translation from Spanish, Portuguese, or Chinese, is available from the publisher, SAGE; use of this service does not guarantee acceptance of the manuscript by the journal.

4.1.3 Units of measurement

SI units of measurement (International System of Units) must be used (may include conventional units in brackets). Express centrifugal speed in relative centrifugal force ($\times g$) and not in revolutions per minute. Liter = L.

4.2 Detailed manuscript layout

4.2.1 Title page

Manuscript page 1: Title of paper, authors' first name, middle initial, last name (e.g., John D. Doe); name and location of each author's institution(s); name, postal address, and email of the corresponding author; and a **short running title** not to exceed 60 characters (including spaces). Please set up title and authors as in a recent issue of JVDI. Use sentence case for Article title.

Example:

Toward a multiplexed serotyping immunoassay for foot-and-mouth disease virus

Julie Perkins,* Alfonso Clavijo,* Josue I. Ortiz, Timothy J. Salo, Hilary J. Holland, Benjamin J. Hindson, Mary T. McBride¹

Lawrence Livermore National Laboratory, Livermore, CA (Perkins, Ortiz, Hindson, McBride); Canadian Food Inspection Agency, National Center for Foreign Animal Disease, Winnipeg, Manitoba, Canada (Clavijo, Salo, Holland).

¹Corresponding author: Mary T. McBride, Lawrence Livermore National Laboratory, 7000 East Avenue, Livermore, CA 94551. xxxxx@llnl.gov

*These authors contributed equally to this work.

Running head: Multiplexed serotyping immunoassay for FMDV

4.2.2 Abstract

Manuscript page 2: Limit the abstract to **250 words or fewer** (Full Scientific Reports) or **200 words or fewer** (Brief Communications), and write as a single paragraph. It must be factual and concise, yet complete enough to be able to stand alone without reference to the text. State conclusions clearly: “Results are discussed” is unacceptable. *Do not use reference citations in the Abstract.*

4.2.3 Key words

Manuscript page 2: Using terms from the medical subject headings (MeSH) list of the U.S. National Library of Medicine, provide an alphabetical list of key words or phrases not to exceed 80 characters (including spaces). Note key words directly below, and on the same page as, the Abstract. *Spell out abbreviations at first use.* During online submission, SAGE Track limits the number of key words that can be submitted. This has no bearing on the list included in your manuscript.

4.2.4 Manuscript sections

- Review Articles: Abstract (≤ 250 words), Introduction, and appropriate section headings and subheadings chosen by the author.
- Full Scientific Reports: Abstract (≤ 250 words), Introduction, Materials and methods, Results, Discussion, Acknowledgments (if any), Declaration of conflicting interests, Funding, Supplemental material (if any), References, Tables (if any), and Figure legends (if any). Do not use subheads in Introduction and Discussion. Do not summarize your findings (In conclusion...) at the end of the manuscript (avoid repeat of Abstract).
- Brief Communications: Abstract (≤ 200 words), body of manuscript (no section or subheadings), Acknowledgments (if any), Declaration of conflicting interests, Funding, Supplemental material (if any), References ($n \leq 20$), Tables (if any), and Figure legends (if any; no more than 1 plate of 4 Figures). Do not summarize your findings (In conclusion...) at the end of the manuscript (avoid repeat of Abstract).

Acknowledgments

In the Acknowledgments section, list all contributors who do not meet the criteria for authorship. Examples of those who might be acknowledged include a person who provided purely technical help, writing assistance, or a department chair who provided only general support. Authors are to disclose whether they had any writing assistance and identify the entity that paid for this assistance.

Sources and manufacturers

Cite the name and location of a manufacturer in parentheses at the appropriate location within the text.

Use generic names of drugs in the text, with the brand name in parentheses.

Example:

The Microflex LT MALDI-TOF mass spectrometer (Bruker Daltonics, Billerica, MA) was used in our study. The mass spectrometer was calibrated for molecular weights with a range of 3,637–16,952 Da prior to sample testing using the bacterial test standard (Bruker Daltonics), as per manufacturer's recommendations.

Conflicting interests

Required section. A statement is required from all authors to be carried within the paginated pages of all published articles, under the heading "Declaration of conflicting interests". If no conflicting interests exist, please use the following text:

Declaration of conflicting interests

The authors declared no potential conflicts of interest with respect to the research, authorship, and/or publication of this article.

When making a declaration, the disclosure information must be specific and include any financial relationship that authors of the article have with any sponsoring organization and the for-profit interests the organization represents, and with any for-profit product discussed or implied in the text of the article.

Any commercial or financial involvements that might represent an appearance of a conflict of interest need to be additionally disclosed in the covering letter accompanying your article to assist the Editor in evaluating whether sufficient disclosure has been made within the Declaration of Conflicting Interests provided in the article. For more information please visit the SAGE Journal Author Gateway.

Publication of papers dealing with a commercial product or laboratory test does not convey or imply an endorsement by the Journal of Veterinary Diagnostic Investigation or the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians.

Funding

Required section. Disclose any funding sources, as well as grant numbers. If no outside funding was used, please use the following text:

Funding

The authors received no financial support for the research, authorship, and/or publication of this article.

Supplemental material

If your manuscript contains supplementary tables or figures, please add the following section

Supplementary material

Supplementary material for this article is available online.

References

JVDI follows the reference style shown in **Appendix A**. In the text, identify references numerically with superscript numbers placed after the punctuation mark. *Do not use names of authors in the text.*

Examples: Previous studies^{1,3,25} have shown....
ELISA was performed as described previously.¹⁰

In the Reference list, list references alphabetically, according to the first author's last name, and number consecutively. **See Appendix A.**

Authors are responsible for the accuracy of all references. List only peer-reviewed material that has been accepted for publication, and government materials, in the References section. *URLs, personal communications, unpublished observations, dissertations, abstract-only citations, meeting/conference/workshop proceedings, and citations from other non-refereed publications are not acceptable references; they must be cited in the text within parentheses. See Appendix A.*

Tables

Tables appear on separate pages following the References. The table title appears directly above the table. Number tables consecutively with Arabic numerals and cite consecutively in the text. Spell out all abbreviations in alphabetical order using table footnotes (e.g., M = male; ND = not determined; ...). Indicate references to items other than abbreviations using the following sequential symbols (*, †, ‡, §, ‖, #, ¶, **).

Example:

Table 1. Results of a selective enrichment broth with real-time PCR assay for *Salmonella*, expressed as Ct values, for recent clinical isolates spiked into an environmental matrix from a poultry farm.

Origin	Serogroup	Seroovar	Ct value for indicated dilution (cfu/mL)		
			10,000	100	10
Bovine feces	NG	Cerro	13.4	13.5	14.2
	B	Typhimurium	15.6	15.5	14.7
	C	Montevideo	14.5	15.6	14.8
	K	Cerro	15.0	14.6	15.3
Bovine small intestine	B	4,5,12:i:-	16.0	15.0	14.2
Avian drag swab	C1	Thompson	16.7	18.6	17.8
Reptile feces	NG	Arizona III_53:z10:z35	14.0	14.9	17.4
Bovine lung	D1	Dublin	29.0	35.1*	*

Ct = cycle threshold; NG = non-groupable.

* All samples were culture-positive except those marked by asterisk.

Figure legends

Every figure must have a legend. Legends appear on a separate page following the References or Tables. Identify animal species, organ, or tissue, and describe the figure in a continuous phrase or sentence. Indicate stains on light and electron micrographs within the figure legend. See also *Image magnifications* in section 5.

Example:

Figure 1. Multifocal necrosis in a chicken liver. H&E. Bar = 20 µm.

Related series of figures may be grouped into plates.

Example:

Figures 1–4. Membranous ventricular septal aneurysm in a black-tailed prairie dog. **Figure 1.** A multinodular dark red mass with a smooth and shiny surface projects into the lumen of the right ventricle (RV) from the interventricular septum in the area of the septal cusp of the tricuspid valve. Black line indicates plane of section in Figures 2–4. **Figure 2.** Longitudinal section of the heart through the mass including right atrium (RA), right ventricle, and left ventricle (LV), showing an absent membranous interventricular septum (arrow) with a thin wall separating the left and right ventricles. This wall is formed by the septal cusp of the tricuspid valve, the free edge of which is adherent to the interventricular septum. A large lamellated recent thrombus fills the aneurysmal space (asterisk). H&E. **Figure 3.** The septal cusp of the tricuspid valve separating the left and right ventricular lumina is strongly alcianophilic on the atrial aspect, similar to the aortic (top left) and parietal tricuspid (top center) valve cusps. Inset shows a higher magnification of the cusp (boxed) . Alcian blue and periodic acid–Schiff. **Figure 4.** The septal cusp of the tricuspid valve separating the left and right ventricular lumina is densely collagenous on the ventricular aspect, with a loose collagenous matrix on the atrial aspect, similar to the aortic (top left) and parietal tricuspid (top center) valve cusps. Inset shows a higher magnification of the cusp (boxed). Masson trichrome.

5. Figures

Failure to submit figures in the required format and resolution will result in immediate rejection. Figures must NOT be embedded in the text document, but submitted separately. Design single illustrations for one column. Design illustrations with figure panels to reproduce in 2 columns. Do not exceed maximum file size of 5 MB.

- 1-column width is 20 picas (85 mm, 3.3 in).
- 2-column width is 41 picas (174 mm, 6.8 in).

Acceptable formats are .tiff and .jpg

- minimum acceptable resolution is 300 pixels/inch (120 pixels/cm) for half-tones (i.e., photographs, histo images)
- minimum acceptable resolution is 800 pixels/inch (480 pixels/cm) for line art (i.e., graphs, charts, maps)

Group multiple color figures into a composite figure separated by a thin white line, with the individual panels clearly identified (i.e., **1, 2, 3, etc.**) in Arial, located in the bottom left corner of each image. Save figures as separate files with the figure number (Fig. 1, Fig. 2, Figs 3–5, etc.) as the file name (*do not use figure numbers and/or titles as part of the image*).

Submit gross and light microscopic images in color if possible. Limit image modification or enhancement to that obtainable by ordinary photographic techniques or to adjustment of color balance or contrast by a photo editor software. If the color balance or contrast in your figures is unacceptable, the photo editors may make suitable adjustments. Micrographs cannot contain photographic or tissue artifacts and the images must be evenly lit with backgrounds of photomicrographs (places where there is no tissue) white. Electron micrographs must have a scale bar in the figure; scale bars for light microscopic images may be used if deemed necessary by the authors, but are not required. Scale bars may be black or white (depending on the background) and are located on the bottom right corner of the image. In gross photographs, locate the head to the right; in photomicrographs, orient the surface of the skin or mucous membrane at the top of the figure. Grass, surgery drapes, bodily fluids, gloves, etc., must be digitally edited out and replaced with a more or less uniform blue or black background. Scale bars are acceptable but case numbers or other identification legends are not. **Please submit figures UN-flattened to allow for editing if needed.**

Image magnifications

In the Figure legend, there is no requirement to indicate image size. If an image size of a photomicrograph is used, only state “original objective 10×”, etc. Do not include calculations for camera adapter lens, camera eyepiece lens,

alteration of a photomicrograph with computer software, etc. If cell or object size is critical to the understanding of the image, then a black size bar may be used in the lower right-hand corner with an indication of μm size in the legend. Please do not place the μm size on the Figure itself.

JVDI recommends saving your images as .tiff files with LZW compression. LZW compression will reduce file size (sometimes dramatically) without affecting quality. When you are saving a file such as a

.tiff from any package such as Photoshop, you are given the option of compressing the file. LZW compression will speed up the upload and download times and will not affect your image in a negative way.

6. Supplementary files

Supplementary data should be referenced in the text.

Example:

Laboratories were asked to provide an ordered list of the 10 most common bacterial isolates on which they performed antimicrobial susceptibility testing (AST) across all animal species (Table 2; Supplementary Table 1).

JVDI, through SAGE Publications, is able to host supplementary materials online, alongside the full text of articles. Supplementary materials are generally files that were used to create the research (such as datasets, dendrograms, etc.) or may be additional pieces to the article that could not be included in the print version (such as audio/video material, tables, figures, or raw data that is not feasible or possible to produce in print form). See SAGE for more information.

7. Page proofs

The Corresponding Author will receive page proofs by email from the Sage Production Editor within 4–6 weeks from time of acceptance.

NOTE: For **new** and **revised** manuscript submissions, our submission site generates a pdf of your files (main document, figures, supplementary material) at the end of your submission. You are required to check the pdf to verify that all of your files have uploaded successfully and that the files are in the correct order of appearance. **The pdf will display your figures at a smaller size and lower resolution to help the pdf load faster. Your original files are not altered during this process.** The Images Editor evaluates your figures from your original files, and not from the pdf.

8. New manuscript submission

1. Submit all parts of the manuscript via SAGE Track at <https://mc.manuscriptcentral.com/jvdi>
2. If you have previously submitted or reviewed a manuscript using SAGE Track, use your User ID and Password to log in.
3. If you are not registered, click on the “Create Account” tab in the upper right-hand corner of the home page and follow the on-screen instructions.
4. Click on the Author Center, and follow the submission process, providing information when prompted.

9. Revised manuscript submission

1. Use your User ID and Password to log in to the SAGE Track home page: <https://mc.manuscriptcentral.com/jvdi>
2. Click on Author Center, then Manuscripts with Decisions.
3. Locate the manuscript you wish to revise and click Create a Revision.
4. You will be prompted to respond to the comments made by the Editor and/or Reviewers. *Important:* Address each comment, and detail your changes in the space provided or by uploading a Word document with the reviewers’ comments listed and your response to each.
5. Follow the submission process, providing information when prompted.

10. Help

If you experience any problems during the online submission process, please consult the SAGE Track online guide, which provides detailed submission instructions. Holly Farrell, the Managing Editor (editorial@aavld.org) is also available for assistance.

APPENDIX A

Types of refereed references permissible in reference list

Journal article with more than two authors

Kirkman MA, et al. Quality-of-life after anterior skull base surgery: a systematic review. *J Neurol Surg B Skull Base* 2014;75:73–89.

Journal article in language other than English

Trindade AB, et al. Lipossarcoma em caturrita (*Myiopsitta monachus*) [Liposarcoma in a caturrita (*Myiopsitta monachus*)]. *Ciência Anim Bras* 2010;11:971–976. Portuguese.

Journal article in a supplement

Schultz RD, et al. Age and long-term protective immunity in dogs and cats. *J Comp Pathol* 2010;142(Suppl 1):S102–S108.

Journal article forthcoming

Savidge C, et al. *Anaplasma phagocytophilum* infection of domestic cats: 16 cases from the northeastern USA. *J Feline Med Surg* 2015. Epub ahead of print.

Schvartz G, et al. Seroprevalence of equine granulocytic anaplasmosis and Lyme borreliosis in Canada as determined by a point-of-care ELISA. *Can Vet J*. In press.

Chapter in a book

Craig LE, et al. Bones and joints. In: Maxie MG, ed. Jubb, Kennedy, and Palmer's Pathology of Domestic

Animals. 6th ed. Vol. 1. St. Louis, MO: Elsevier, 2016:16–163.

Book in a series

Koestner A, et al. Histological Classification of Tumors of the Nervous System of Domestic Animals. 2nd series. (Vol. 5, WHO International Classification of Tumors of Domestic Animals). Washington, DC: Armed Forces Institute of Pathology, 1999.

Scientific report

Simpson VR. Health status of otters in southern and south west England 1996–2003. Bristol UK:

Environment Agency, 2007. Science report SC010064/SR1.

Barker B, Degenhardt L. Accidental drug-induced deaths in Australia 1997–2001. Sydney, Australia:

University of New South Wales, National Drug and Alcohol Research Centre, 2003.

Patent

Pagedas AC, inventor; ABS Inc., assignee. Flexible endoscopic grasping and cutting device and positioning tool assembly. United States patent US 20020103498. 2002 Aug 1.

CLSI document

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Defining, establishing, and verifying reference intervals in the clinical laboratory; approved guideline. 3rd ed. Wayne, PA: CLSI, 2010. CLSI document EP28-A3C3.

European Commission

European Commission. Commission Decision (2002/657/EC) of 12 August 2002 implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results. Off J Eur Commun 2002;L221:8–36.

Online database

Haig SM. Piping plover. 2002 May 2 [revised 2004 Nov 1; cited 2014 Nov 25] In: Poole A, ed. The Birds of North America Online database [Internet]. Ithaca, NY: Cornell Laboratory of Ornithology. Available

from: http://bna.birds.cornell.edu/bna/account/piping_plover

The Birds of North America Online database [Internet]. Ithaca, NY: Cornell Laboratory of Ornithology.

[cited 2014 Nov 25]. Available from: <http://bna.birds.cornell.edu/bna>

Types of non-refereed references (IN-TEXT citation only)

Conference proceedings

(Cooke et al. Facilitating safe international movement of horses for the purpose of participating in equestrian events. Proc 9th Int Conf Equine Infectious Diseases; Oct 2012; Lexington, KY)

Dissertation/thesis

(Zehr ESN. Relatedness of *Haemophilus parasuis* strains and their proteins' possible roles as virulence factors [PhD dissertation]. Ames, IA: Iowa State University, 2008)

(Roguskie JM. The role of *Pseudomonas aeruginosa* 1244 pilin glycan in virulence [master's thesis]. Pittsburgh, PA: Duquesne University, 2005)

Newspaper article

(Gaul G. When geography influences treatment options. Washington Post (Maryland Ed.). 2005 Jul 24:Sect. A:12 (col. 1))

URL use in text

"The Australian Government requires animals destined for export to be held in a registered facility (also known as an "assembly depot") for a minimum period of time prior to being loaded onto a vessel (Australian Standards for the Export of Livestock, Standard 3, http://www.agriculture.gov.au/biosecurity/export/live-animals/advisory-notices/2011/export_advisory_notice_2011-01)."

"There is currently no *H. somni* vaccination registered for use in Australia (<https://portal.apvma.gov.au/pubcris>) so the relatively high prevalence of *H. somni* reported herein (42%) is not due to detection of shedding of an attenuated vaccine strain. Nasal isolation rates at feedlot entry have not been associated with subsequent respiratory disease in feedlot cattle.^{1,24}"

CAPÍTULO III

Trabalho redigido para submissão no periódico "The Veterinary Journal"

Normas: <https://www.elsevier.com/journals/the-veterinary-journal/10900233/guide-for-authors>

Frequência alélica da mutação c.115A>T no gene COL4A4 responsável pela Nefropatia Familiar em cães da raça Cocker Spaniel Inglês

(Allelic frequency of mutations c.115A>T in the COL4A4 gene responsible for Familial Nephropathy in English Cocker Spaniel Dogs)

Resumo

A nefropatia familiar é uma doença glomerular progressiva primária em cães, associada à mutação c.115A>T no gene COL4A4 em cães Cocker Spaniel Inglês (CSI). A doença é herdada de maneira autossômica recessiva, sendo descrita no CSI desde o final dos anos 1940. Até o momento, não há dados sobre a prevalência dessa doença no Brasil, portanto o objetivo deste estudo foi avaliar a frequência alélica dessa mutação em CSI no Brasil. As amostras de DNA utilizadas foram purificadas a partir de amostras de sangue ou esfregaços bucais de 221 cães CSI. Fragmentos do DNA, contendo a mutação, foram amplificados por PCR e submetidos ao sequenciamento gênico direto. A frequência alélica da mutação foi de 0,9%. A presença da mutação na população de CSI no Brasil revela a importância de realizar os testes de genotipagem nestes cães como método de diagnóstico da doença e identificação de animais heterozigotos, visando a orientação do acasalamento para reduzir os casos clínicos da doença.

Palavras-chave: diagnóstico, doença genética, genotipagem, nefropatia familiar, COL4A4

Abstract

Familial Nephropathy is a primary progressive glomerular disease in dogs, which is associated with the c.115A>T mutation in the *COL4A4* gene in English Cocker Spaniel (ECS) dogs. The disease is inherited in an autosomal recessive trait. It has been described in this breed since the late 1940s. To date, there are no data on the prevalence of this disease in Brazil, so the main of this study was to evaluate the allelic frequency of this mutation in ECS dogs in this country. The DNA samples used were purified from blood samples or buccal swabs from 221 ECS dogs. Fragments of the DNA, containing the mutation, were amplified by PCR and submitted to direct gene sequencing. The allelic frequency of the mutation was 0.9%. The presence of the mutation in the ECS dog population in Brazil reveals the importance of performing the genotyping tests in these dogs as a method of diagnosis of the disease and identification of heterozygous animals, aiming at the orientation of mating to reduce clinical cases of disease.

Keywords: diagnosis, genetic disease, genotyping, familial nephropathy, *COL4A4*

Introdução

A Nefropatia Familiar é o termo diagnóstico mundialmente usado para se referir à nefropatia hereditária autossômica recessiva, análoga a Síndrome de Alport em humanos (Knebelmann et al., 1996). Descrita no Cocker Spaniel Inglês (CSI) inicialmente na década de 40 (Krook, 1957), desde então vários trabalhos descreveram achados clínicos e laboratoriais na raça (Steward et al., 1984; Robinson et al., 1985; Koeman et al., 1989).

As anormalidades do colágeno tipo IV da membrana basal glomerular, que caracterizam a doença, foram associadas em humanos a mutações em três genes, *COL4A3*, *COL4A4* e *COL4A5* (Lemmink et al., 1994; Mochizuki et al., 1994; Knebelmann et al., 1996). Já em cães, são descritas duas mutações no gene *COL4A5*, ligadas ao cromossomo X e duas no gene *COL4A4* que são autossômicas recessivas (Lees, 2013). No CSI a mutação c.115A>T no gene

COL4A4 leva a formação de um stop codon prematuro no éxon 3 provocando a produção de uma proteína truncada afuncional (Davidson et al., 2007). É uma doença juvenil, progressiva e fatal, com sinais clínicos de insuficiência renal crônica, cuja proteinúria persistente é um forte indicativo (De Brot et al., 2017). O diagnóstico pode ser feito com microscopia eletrônica ou imunohistoquímica (Lees et al., 1998) e atualmente, há o teste genético.

Dados de prevalência da mutação c.115A>T no gene *COL4A4* no CSI são escassos na literatura mundial. Foi observada em cães desta raça dos EUA, Canadá e Grã-Bretanha, porém não houve estudos sobre sua distribuição e frequência ao redor do mundo (Davidson et al., 2007). Sendo assim, o objetivo deste estudo foi avaliar a frequência alélica desta mutação no Brasil e demonstrar a importância da utilização de técnicas moleculares que a detectam precocemente, permitindo aos proprietários e criadores traçar estratégias para reduzir a ocorrência de casos clínicos ou até mesmo erradicar a doença na raça (Davidson et al., 2007). Além disso, a oferta do teste genético no Brasil, permitirá aos Médicos Veterinários o diagnóstico etiológico desta enfermidade, de modo mais acessível que os testes realizados fora do país.

Materiais e Métodos

Todos os procedimentos realizados nos animais deste estudo foram previamente aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da FMVZ, UNESP (Protocolo número 0218/2016). Foram utilizadas amostras de 221 animais (149 fêmeas e 72 machos) do banco de DNA do Laboratório de Biologia Molecular da Clínica Veterinária da FMVZ-UNESP de Botucatu extraídas a partir de sangue ou swab bucal de cães da raça Cocker Spaniel Inglês, sendo 131 provenientes de canis filiados à Confederação Brasileira de Cinofilia (CBKC) e 90 sem histórico de registro, dos quais 59 eram provenientes de animais que haviam sido atendidos no Hospital Veterinário da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da UNESP de Botucatu.

O DNA foi extraído das amostras de sangue e swab bucal com o kit Illustra Blood GenomicPrep Mini Spin Kit (GE Healthcare), seguindo as recomendações do fabricante. Primers específicos para amplificação do segmento alvo contendo o ponto da mutação no gene *COL4A4* (Forward CTGACATAATCATCAGCCCTCTC; Reverse TCTCTAGGGTTCGTGCATCT) foram desenhados no programa Primer Express™ (Applied Biosystems) e a especificidade foi testada in silico (BLAST). As reações de PCR foram padronizadas para um volume final de 25 µL utilizando 12,5 µL da enzima GoTaq® Green Master Mix (Promega™), 0,75 µL de cada *primer*, 8,5 µL de água livre de endonucleases e 2,5 µL do DNA. A termociclagem foi realizada nas seguintes condições: 94°C por 1 min., seguida por 40 ciclos de 94°C por 2 min., 59° por 30s e 72°C por 30s e extensão final de 72°C por 1 min.

Os tamanhos dos produtos amplificados foram verificados por eletroforese em gel de agarose a 1,5% corado com GelRed™ (Biotium) e comparados com o 100 pb DNA ladder (Norgen™, BioTek Corporation). Posteriormente, esses produtos foram purificados com o Wizard® SV Gel e PCR Clean-Up System, Promega®, EUA, seguindo as recomendações do fabricante e submetidos ao sequenciamento direto automatizado, utilizando-se 10 µL do produto de PCR purificado e 5 µL do primer forward. As sequências e eletroferogramas obtidos foram alinhados para realização da genotipagem Sequencher™ (Gene Code Corporation). Os resultados foram analisados e expostos de forma descritiva, possibilitando o estabelecimento de informações epidemiológicas, como a frequência alélica desta mutação no Brasil. Além disso, os dados de frequência alélica foram comparados entre machos e fêmeas, assim como entre animais registrados e sem histórico de registro (Teste Exato de Fisher), utilizando o GraphPad Prism® 5.01 software (GraphPad Software) e considerando $p < 0,05$.

Resultados

Do total de 221 amostras, 98,2% (217/221) foram identificados como *wild type*, ou seja, não apresentaram alelo com a mutação c.115A>T no gene COL4A4 e 1,8% (4/221) como heterozigotos, apresentando apenas um alelo mutado. Portanto a frequência alélica encontrada foi de 0,9%. Não houve diferença entre machos e fêmeas ($p = 0,3088$) assim como entre o grupo de animais registrados e o de animais sem histórico de registro ($p = 0,3067$).

A frequência alélica observada entre os 90 animais sem histórico de registro, foi de 1,7%, sendo que 96,6% (87/90) eram *wild type* e 3,4% (3/90) eram heterozigotos. Dentre os 132 animais registrados pela CBKC, provenientes de 17 canis diferentes, 99,2% (130/131) eram *wild type* e 0,8% (1/131) era heterozigoto, portanto a frequência alélica foi de 0,4%. Todos responsáveis por esses canis tinham conhecimento da doença.

Entre os 59 animais testados que haviam sido atendidos no Hospital Veterinário da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da UNESP de Botucatu, 15 apresentavam queixa de Doença Renal Crônica (DRC), sendo que 13 deles eram *wild type* e dois eram heterozigotos para a mutação avaliada.

Discussão

A frequência alélica geral da mutação c.115A>T neste estudo foi de 0.9%, enquanto que entre os 131 animais provenientes de canis filiados a CBKC, com idades entre 4 meses e 12 anos, esta frequência foi de 0,4%. Nesse tipo de criação, raramente um animal é acasalado antes de completar 24 meses, o que consequentemente evitaria a reprodução de possíveis animais afetados, uma vez que estes vêm a óbito geralmente até essa idade (Steward, 1984). Além disso, a doença é de conhecimento destes criadores e possivelmente a baixa frequência alélica neste grupo seja também reflexo de um processo de seleção que já vem sendo realizado por alguns deles. Da mesma forma, a frequência

alélica desta mutação no Reino Unido, entre 3.465 CSI registrados no The Kennel Club¹, foi de 0,4% entre os anos de 2006 e 2018.

Os 90 animais sem histórico de registro, com idades entre 1 e 17 anos, eram provenientes de criadores não profissionais, que em sua maioria desconhecem a doença na raça e realizam acasalamentos indiscriminados. Apesar de não ter sido observada diferença estatística entre este grupo e o de cães registrados ($p = 0,3067$), sugere-se que a realização de acasalamentos indiscriminados por parte dos criadores não profissionais, contribua com a manutenção do alelo mutado nessa raça, possivelmente em maior frequência neste grupo.

Os animais atendidos no Hospital Veterinário da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da UNESP de Botucatu, com suspeita ou confirmação de Doença Renal Crônica tinham idade variando entre 6 e 14 anos, fora da faixa etária de manifestação da doença, 6 a 24 meses (De Brot et al., 2017), portanto não era esperada a identificação de animais homozigotos afetados dentro deste grupo.

O diagnóstico da FN requer métodos mais especializados, tais como a microscopia eletrônica e a imunohistoquímica, ou ambos. A Imunohistoquímica não é amplamente disponível (Lees, 2013) Possivelmente por essa dificuldade, além de a FN ser uma doença raramente encontrada na rotina clínica, sugere-se que parte dos veterinários brasileiros não a conheçam, o que também pode contribuir com o fato de que relatos clínicos da doença no Brasil não tenham sido encontrados na literatura consultada.

A genotipagem dos animais para a mutação c.115A>T, é um importante método de diagnóstico, principalmente dos animais mantidos na reprodução, pois apesar da baixa prevalência de animais heterozigotos, essa mutação está presente no plantel brasileiro da raça. E como descrito na literatura, os animais

¹See: Spaniel (Cocker) DNA screening. <https://www.thekennelclub.org.uk/health/for-breeders/dna-screening-schemes-and-results/dna-screening-for-breeds-s-z/spaniel-cocker-dna-screening/> (accessed 20 February 2019)

heterozigotos não apresentam alterações associadas a nefropatia hereditária (Lees et al., 1998). A ausência de sinais clínicos nos animais heterozigotos dificulta o controle da doença, sendo a realização da genotipagem destes animais medida necessária para a prevenção de animais clinicamente afetados.

Referências

- Davidson, A.G., Bell R.J., Lees, G.E., Kashtan, C.E., Davidson, G.S., Murphy, K.E., 2007. Genetic Cause of Autosomal Recessive Hereditary Nephropathy in the English Cocker Spaniel. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 21, 394-401.
- De Brot, S., Adamany, J., Baiker, K., Dhumeaux, M., Allegrucci, C., Polledo, I., Grau-Roma, L., 2017. Pathology in practice. Hereditary nephropathy (familial nephropathy) in an english cocker spaniel. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 251, 661-664.
- Knebelmann, B., Breillat, C., Forestier, L., Arrondel, C., Jacassier, D., Giatras, I., Drouot, L., Deschenes, G., Grunfeld, J.P., Broyer, M., Gubler, M.C., Antignac, C., 1996. Spectrum of Mutations in the COL4A5 Collagen Gene in X-Linked Alport Syndrome. *American Journal Human Genetics* 59, 1221-1232.
- Koeman, J.P., Ezilius, J.W., Biewenga, W.J., Van Den Brom, W.E., Gruys, E., 1989. Familial nephropathy in cocker spaniels. *Deutsche Tierärztliche Wochenschrift* 96, 174-179.
- Krook, L., 1957. The pathology of renal cortical hypoplasia in the dog. *Nordisk veterinaermedicin* 9, 161-176.

- Lees, G.E., Helman, R.G., Kashtan, C.E., Michael, A.F., Homco, L.D., Millichamp, N.J., Ninomiya, Y., Sado, Y., Naito, I., Kim, Y., 1998. A model of autosomal recessive Alport syndrome in English cocker spaniel dogs. *Kidney International* 54, 706-719.
- Lees, G.E., 2013. Kidney diseases caused by glomerular basement membrane type IV collagen defects in dogs. *Journal of Veterinary Emergency and Critical Care (San Antonio)* 23,184-193.
- Lemmink, H.H., Mochizuki, T., Van Den Heuvel, L.P., Schröder, C.H., Barrientos, A., Monnens, L.A., Van Oost, B.A., Brunner, H.G., Reenders, S.T., Smeets, H.J., 1994. Mutations in the type IV collagen alpha 3 (COL4A3) gene in autosomal recessive Alport syndrome. *Human Molecular Genetics* 3, 1269-1273.
- Mochizuki, T., Lemmink, H.H., Mariyama, M., Antignac, C., Gubler, M.C., Pirson, Y., Verellen-Dumoulin, C., Chan, B., Schröder, C.H., Smeets, H.J., 1994. Identification of mutations in the alpha 3(IV) and alpha 4(IV) collagen genes in autosomal recessive Alport syndrome. *Nature Genetics* 8, 77-81.
- Robinson, W.F., Huxtable, C.R., Gooding J.P., 1985. Familial nephropathy in cocker spaniels. *Australian Veterinary Journal* 62,109-112.
- Steward, A.P., Macdougall, D.F., 1984. Familial nephropathy in the Cocker Spaniel. *Journal of Small Animal Practice* 25, 15-24.

Normas de submissão: Instruções aos autores: The Veterinary Journal disponível em <https://www.elsevier.com/journals/the-veterinary-journal/1090-0233?generatepdf=true>.

Guide for Authors

The Veterinary Journal (established 1875) is an international journal of veterinary research that publishes original papers and reviews on all aspects of veterinary science. Contributions reporting investigative work in the scientific disciplines involving veterinary species are particularly welcome where they make a significant contribution to the field. The Editors will be pleased to consider suggestions for Special Issues on subjects of topical importance. The journal also publishes Guest Editorials and occasionally Personal Views, but does not have a Letters section. Book Reviews are published on-line.

Manuscript types

Manuscripts may describe original work in a Full Paper (Original Article) or a Short Communication, or may form a Review of the existing state of knowledge on a particular aspect of veterinary science. Reviews should, in general, be written in support of original investigations. Case Reports are not published.

Animal welfare

Where animals have been used in a study, the institutional ethical or animal welfare Authority under which the work was conducted must be stated, along with the specific authorisation reference number and the date of approval. Such studies must meet Animals in Research: Reporting In Vivo Experiments (ARRIVE) guidelines (view article). The Veterinary Journal will reject any paper where there is reason to believe that animals have been subjected to unnecessary or avoidable pain or distress.

Reporting standards

The Editors and reviewers use several published guidelines for reporting standards (see Appendix below). Conforming to these reporting standards allows

the Editors and reviewers to assess the quality and originality of submissions and offers readers sufficient information to judge the relevance of the work in an appropriate context. Omission of requirements specified in the relevant guidelines for reporting standards may lead to rejection of a manuscript. For further information, please see The Veterinary Journal (2010) 184, 249-250 (view article).

Submission of manuscripts

Submission of manuscripts to The Veterinary Journal is on-line via the Elsevier EditorialSystem

- please see <http://ees.elsevier.com/ytvjl>. Authors will be guided through the manuscript submission system step-by-step, enabling them to upload files directly from their computer. Options will be given for Authors to select a set of classifications for their papers, as well as a category designation (Original Article, Review, Short Communication etc.), from a given list.

Authors must submit articles in WORD format and not as PDF files. PDF proofs will be automatically generated from uploaded files and these are used for subsequent reviewing. Queries concerning the submission process or journal procedures should be sent by e-mail to: AuthorSupport@elsevier.com.

The Corresponding Author, who is normally the Author submitting the paper, will be asked to confirm that the article is original and is not being considered for peer-reviewed publication elsewhere. Submission also implies that all of the Authors have approved the paper for release and are in agreement with its content. Upon acceptance of the article by The Veterinary Journal, the Author(s) will be asked to transfer the copyright of the article to the Publisher. This transfer will ensure the widest possible dissemination of information.

The Corresponding Author will also be required to confirm that all Authors have made substantial contributions to (1) the conception and design of the study or acquisition of data or analysis and interpretation of data, (2) drafting the article or revising it critically for important intellectual content, and (3) final approval of the version to be submitted. Contributors who do not meet these criteria for

authorship should be listed in an Acknowledgements section. Examples of those who might be acknowledged include a person who provided purely technical help, writing assistance, or a Departmental Chair who gave general support.

Plagiarism

Plagiarism is globally recognised as a serious academic offence. Please read and adhere to the guidelines for Ethics in Publishing (view article). The Corresponding Author will be asked to tick a box to confirm acceptance of these guidelines before approval of the PDF and completion of the submission process.

Conflict of interest

At the end of the text, under a subheading "Conflict of interest statement" all Authors must disclose any financial and personal relationships with other people or organisations that could influence (bias) their work. Examples of potential conflicts of interest include employment, consultancies, stock ownership, honoraria, paid expert testimony, patent applications or registrations. Conflicts of interest may also exist where a commercial company donates (or provides funding for a study that uses) drugs, equipment, test kits, vaccines, reagents or other products manufactured or marketed by that company. If no conflicts of interest exist, this should be stated as "None of the authors of this paper has a financial or personal relationship with other people or organisations that could inappropriately influence or bias the content of the paper".

Role of the funding source

All sources of funding should be declared in an Acknowledgements section at the end of the text. Authors should declare the role of study sponsors, if any, in the study design, in the collection, analysis and interpretation of data, in the writing of the manuscript and in the decision to submit the manuscript for publication.

Open Access

This journal offers authors two choices to publish their research;

1. Open Access

- Articles are freely available to both subscribers and the wider public with permitted reuse
- An Open Access publication fee is payable by authors or their research funder

2.Subscription

- Articles are made available to subscribers as well as developing countries and patient groups through our access programs (<http://www.elsevier.com/access>)
- No Open Access publication fee

All articles published Open Access will be immediately and permanently free for everyone to read and download. Permitted reuse is defined by your choice of one of the following Creative Commons user licenses:

Creative Commons Attribution-Non Commercial-ShareAlike (CC BY-NC-SA): for noncommercial purposes, lets others distribute and copy the article, to create extracts, abstracts and other revised versions, adaptations or derivative works of or from an article (such as a translation), to include in a collective work (such as an anthology), to text and data mine the article, as long as they credit the author(s), do not represent the author as endorsing their adaptation of the article, do not modify the article in such a way as to damage the author's honor or reputation, and license their new adaptations or creations under identical terms (CC BY NC SA).

Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs (CC-BY-NC-ND): for non-commercial purposes, lets others distribute and copy the article, and to include in a collective work (such as an anthology), as long as they credit the author(s) and provided they do not alter or modify the article.

Creative Commons Attribution (CC-BY): available only for authors funded by organizations with which we have established an agreement with. For a full list please see <http://www.elsevier.com/journal-authors/funding-body-agreements>

To provide Open Access, this journal has a publication fee which needs to be met by the authors or their research funders for each article published Open Access. Your publication choice will have no effect on the peer review process or acceptance of submitted articles.

The Open Access publication fee for this journal is \$USD 3,000, excluding taxes.

Learn more about Elsevier's pricing policy www.elsevier.com/openaccesspricing

Prior presentation of data

Prior presentation of results, in the form of abstracts, posters or oral presentations at conferences, must be mentioned clearly in the Acknowledgements, with wording along the lines of: "Preliminary results were presented as an Abstract at the 9th International Congress of Veterinary Virology, Madrid, 4th-7th September 2012."

Format and layout

Authors submitting papers that are suitable for consideration but do not comply fully with this Guide will be asked to amend the text and re-submit. Model article formats in WORD are available (click to follow link below as appropriate):

- • Original Article
- • Short Communication
- • Review
- • Guest Editorial
- • Personal View
- • Book Review

Articles must be written in the English language. UK or US English is preferred. Important: A high standard of English is required for all submissions. Authors whose first language is not English are strongly advised to consult a native English speaker familiar with their field or use an English language polishing service to meet the required standards prior to submission. The Editors will

decide whether the use of English is of a satisfactory standard. If not, the submission will be rejected or returned to the Authors for revision. The model articles should be consulted for formatting and style, and may be used as templates.

Please note that there are a number of commercial organisations that will assist non-English speaking Authors in preparing their manuscripts for publication in international peer-reviewed journals. Further advice is available from Elsevier at <http://www.elsevier.com/locate/languagepolishing>. Some such services only offer help to improve the use of English and it remains the Authors responsibility to ensure that TVJ's layout and formatting requirements are also met.

Original Articles should be no longer than 3,000 words in length, excluding the Title page, Abstract, Acknowledgements, Tables, Figures and References. Reviews should be about 4,000 words in length and Short Communications up to 1,000 words.

Continuous line numbers are required throughout the text.

Use double-spacing except for the Title page and References, which should be in single spacing. Times New Roman, font size 12 point, is preferred for all text (including Tables, Figures, References and all symbols). A smaller font size may be used in Tables if space is limiting, and line spacing may also be adjusted in Tables where necessary. Formatting must not be customised since this impedes editing. For example, avoid paragraph spacing functions and linking section titles to paragraphs.

Insert a line break between each paragraph and inset the first line of each new paragraph.

Nucleotide sequences

Submission of a manuscript implies that primary nucleotide sequence data will be deposited with an internationally available repository. Sequence reference numbers should be provided, where appropriate, in the main text, Tables, Figures or as an e-only supplementary file (see below).

Title page

A title page must be included at the start of the article. This should give the paper's title, names of Author(s), the name(s) and address(es) of the institution(s) where the work was done and other Authors' addresses where these differ. If the article is a Review or Short Communication, this should be clearly indicated at the left top on the title page. Insert a page break at the bottom of the title page before the Abstract.

Except where all Authors come from the same department, each Author should be identified using a letter superscript (a,b,c etc.), and the Corresponding Author should be designated by an asterisk (*) as follows:

Prevalence of gastric ulcers in endurance horses: A preliminary report.

Jorge E. Nieto a^{*}, Jack R. Snyder a, Pablo Beldomenico a, Monica Aleman b, James W. Kerr c, Sharon J. Spier b

a Comparative Gastroenterology Laboratory, Department of Veterinary Surgical and Radiological Sciences, University of California, Davis, CA95616, USA

b Department of Medicine and Epidemiology, University of California, Davis, CA95616, USA

c Napa Equine Veterinary Service, Napa, CA94558, USA

The contact details of the corresponding Author (telephone number and E-mail address but not fax number) should then be given using the following format:

* Corresponding author. Tel.: +1 530 752 0290. E-mail address: jenieto@ucdavis.edu (J.E. Nieto).

If it is desirable to indicate that more than one author contributed equally to the work, the numeric superscript (1) should be placed after the names. Then below the corresponding author details you should state:

1 These authors contributed equally to the work.

It is not usually acceptable for all authors to be acknowledged as equal contributors to a study.

Articles

Original Articles should be arranged as follows: (1) Title page; (2) an Abstract of up to 250 words (with no sub-headings), which should emphasise objectives, the experimental procedure, results and conclusions; up to five Keywords in alphabetical order and in Title case should be supplied below the Abstract; (3) the main text must be sub-divided into Introduction, Materials and methods, Results, Discussion, and Conclusions; (4) Conflict of interest statement; (5) Acknowledgements; (6) Appendix A: Supplementary material (where this is provided; see below); (7) References; (8) Tables; (9) Figure legends; (10) Figures (uploaded as separate files). The sections should not be numbered. Please see the model article provided ([view here](#))

Please note:

- Insert a page break only after the Title page, after the Abstract with Keywords, after the References section, between each Table, and before the Legends to figures.
- The Results and Discussion sections must be distinct and not combined.
- Avoid sub-headings in the Discussion section.
- References must not be included within the Conclusions section.
- The first person (I, we, our) must be avoided in the Abstract, but may be used elsewhere in the paper.

Where Supplementary data are provided (see further information below), use the following wording in the main text after the Acknowledgements:

Appendix A: Supplementary material

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at doi: ...'

Tables should be included within the article and placed sequentially after the References, but before the Figure legend(s), with one Table per page.

Figure legends should be included in the main manuscript file after any Tables. Each figure should be uploaded as a separate file (Fig. 1, Fig. 2 etc.).

Short Communications should follow the requirements for full manuscripts, but the text must not exceed 1,000 words and the paper should not be divided into conventional sections. Headings for the Abstract, Keywords, Acknowledgements, Conflict of interest statement and References should be included, but there should be no other headings or subheadings in the main text. There should be no more than 10 references in a Short Communication. An Abstract of not more than 125 words is required and up to five Keywords should be supplied below it. Please see the model article provided ([view here](#)).

Review Articles may be commissioned or proposed. Authors wishing to submit a review article are advised to contact the Editor at tvj@aht.org.uk. Reviews are about 4000 words in length and may cover any relevant aspect of veterinary science or comparative medicine. Reviews should follow the layout for Original Articles, but with the main text subdivided as appropriate to the subject matter, starting with an Abstract and Introduction and incorporating Conclusions and a Conflict of interest statement. Sections should not be numbered. Please see the model article provided ([view here](#)).

Guest Editorials are commissioned by the editors; unsolicited Guest Editorials must not be submitted. Commissioned Guest Editorials are usually 500-1000 words in length and must follow the layout of the model article provided ([view here](#)). They usually include references, but should not be divided into sections and no Acknowledgements or Conflict of interest statement are required. Where a Guest Editorial is commissioned to accompany another article, it must refer to that article in the text and the reference should be provided in TVJformat at the end of the Editorial.

Personal Views are commissioned by the Editors; unsolicited Personal Views must not be submitted without the agreement of the Editors. Authors must follow

the format of the model article provided (view here). It is at the Editors' discretion whether a Personal View should be sent to reviewers or whether or not it will be published in TVJ. The length of the Personal View must be agreed with the Editors in advance of submission.

AudioSlides

The journal encourages authors to create an AudioSlides presentation with their published article. AudioSlides are brief, webinar-style presentations that are shown next to the online article on ScienceDirect. This gives authors the opportunity to summarize their research in their own words and to help readers understand what the paper is about. More information and examples are available at <http://www.elsevier.com/audioslides>.

Units. Metric units must be used. If other units need to be given, they must be placed in brackets after the metric equivalent. Units, symbols and abbreviations of units should conform to the International System of Units as defined in Baron, D.N., McKenzie-Clarke, H., 2008, Units, Symbols and Abbreviations: A Guide for Authors and Editors in Medicine and Related Sciences, 6th Ed., The Royal Society of Medicine, London (available here). All other abbreviations should be unambiguous and should be clearly explained where they are first mentioned in the Abstract and text. Do not list abbreviations separately.

Note that litre is abbreviated to 'L', millilitre 'mL', (also mmol/L etc.); probability is given as *P* (upper case italics), as in $P < 0.05$; also note 'Student's *t* test' and Mann-Whitney U test; correlation coefficient *r* as in $r = 0.92$, coefficient of determination, r^2 as in $r^2 = 0.72$; standard deviation and standard error should be abbreviated to SD and SE, respectively; hour, minute and second are abbreviated to h, min and s; day, week and year are given in full. For drug dose frequency use e.g. 'three times daily' or '8-hourly' rather than Latin terms such as t.i.d. or q 8 h. Where centrifugation has been performed, use g values not rpm. Other common abbreviations include 'IV' for intravenous or intravenously, 'IM' for intramuscular or intramuscularly, 'SC' for subcutaneous and subcutaneously, 'PO' for per os or orally; use 'vs.' for 'versus'. Use the abbreviation G for gauge of needle. The

symbol for degrees Celsius should be written in the format '°C', with the value separated from the unit by a space, e.g. '37 °C'. Use the WORD symbols for $\pm$, Greek letters etc. Percentages should be referred to as, for example, '15%' or 'Fifteen per cent' when starting a sentence. Note also 'post-mortem' and 'ante-mortem'.

When a number is followed by a unit use the digits as in '10 mL' unless starting a sentence in which case write in full 'Ten microlitres'. When the number describes a quantity of items write the number in full up to ten as 'four sheep' or 'ten tubes' then in digital form thereafter as '24 horses' or '200 blood samples'. Avoid the symbol # or abbreviation 'No.' for 'number'.

Single ('...') quotation marks should be used for specific extracts, as in: "A PubMed search utilizing the search terms 'canine castration local anaesthesia' returned three publications." Where a reference is cited or a quote given, use single quotation marks and place the text in italic font as: "However, in the 'Recommended Guideline for the Conduct and Evaluation of Prognostic Studies in Veterinary Oncology' developed recently by the American College of Veterinary Pathologists ..." Double ("...") quotation marks should be avoided.

Anatomical terminology. Terminology should comply with the World Association of Veterinary Anatomists *Nomina Anatomica Veterinaria* (2005) and terms should be given in English where possible (see: http://www.wava-amav.org/Downloads/nav_2005.pdf).

Currencies. A footnote should be inserted at first use if a currency is given in the text, as in 'UK£5001' and conversion rates provided using the following three currencies US\$, UK£ and Euros (€). The footnote should read as appropriate, for example: '£1 = approx. US\$1.60, €1.24 at 2 December 2012.' Rates can be updated by the Author at proof stage if necessary. An easy to use currency converter is available here: <http://uk.reuters.com/business/currencies>.

Manufacturers. Manufacturers and suppliers should be indicated within the text after the name of the product. For example: 'diazepam (Valium, Roche)' or 'using an infusion pump (Medfusion 2010, Medex)'. Addresses/locations of

manufacturers should not be given and the use of ® or TM should be avoided. Note: proprietary names must not appear in the title or Abstract.

Applying capital letters to directions. Compass directions such as North, South, East and West, as well as their derivatives, such as North-East, North-West, South-East and South-West, should be capitalised when they are used to designate defined or recognised geographical regions, or when they are an integral part of a proper name. Examples include "Eastern Europe", "Southern France", "North-East England", "in the North", "down South", "the West Coast" and "the Eastern Seaboard", "the Western Region of Kazakhstan", "Southern California". Compass directions should not be written with capital letters when they indicate general locations or directions without a specific location. Examples include "bluetongue virus initially spread in a north-westerly direction on air currents", "the northern boundary of the quarantine zone", "cases were clustered in the east of the region", "westerly winds". The first letter of each word of a Compass direction should be capitalised when used to refer to people in a region, particularly in social, cultural or political contexts. Examples include "wildebeest are hunted by the Southern tribes", "horses have been an integral part of Western civilisation since the Middle Ages". Words such as northern, southern, eastern, and western that precede a place name usually are not capitalised, since they indicate a general location within a region. When these words are an integral part of the place name, they should be capitalised. For example, write "northern Connecticut", but "Northern Ireland" and "Western Australia". Websites (URLs). Where a website is appropriate in the text, a footnote should be inserted using sequential numeric superscripts. At the foot of the page, provide the link as follows: ¹See: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>. It is the Authors' responsibility to check that all URLs are active and live at proof stage and if not then the text must be amended accordingly.

References. Authors are strongly advised to use reference management software such as EndNote (see here). However, references should be checked carefully for accuracy and corrected manually to ensure the format matches exactly the TVJ style described below.

Only essential references should be included. Text citations can be in either of two ways: (a) with date in parentheses, e.g. as demonstrated by Mills (2011); or (b) with names and dates in parentheses, e.g. according to recent findings (Mills, 2011). If a citation has more than two Authors the first Author should be given followed by et al. in standard text format (not italicised), e.g. Jones et al. (2007) or (Jones et al., 2007). Where lists of references are cited in the text, they should be placed first chronologically and then alphabetically, e.g. (Philbey et al., 2003; Cassidy and Mills, 2005; Litster, 2010). If two or more references by the same Author(s) published in the same year are cited, they should be distinguished from each other by placing a, b, etc. after the year, e.g., (Laven, 2011a, b; Laven and Smith, 2010a, b). Personal communications should be designated as '(E.A. Blomme, personal communication)'.

Papers that are in press may be cited using the year of acceptance where the digital object identifier (doi number) has been allocated. This can be updated to the year of print publication at the proof stage if the cited paper has been published. In the Reference list, quote the doi number where details of the journal volume and page numbers are yet not known.

Submitted papers should not be cited, but instead should be referred to in the text as, e.g. 'J.P. Cassidy et al., unpublished data'. This can be updated at proof stage where appropriate. Where a paper in press is cited in the manuscript, the Authors may be asked to make a copy of the proofs available to the editors and reviewers.

The Reference list at the end of the paper should be arranged first alphabetically and then further sorted chronologically if necessary. References should be single spaced and a line break should be inserted between each reference. All Authors should be included up to 10, after which you should write 'et al.'; Please note that in all cases Journal titles must be given in full. Volume numbers and full page numbers should be provided, but issue numbers should be omitted. Where a Supplement is cited, give the Supplement number e.g. 'Equine Veterinary Journal Suppl. 37' or 'Journal of Reproduction and Fertility 54 (Suppl. 1), 115-126'. Where

selected pages only have been consulted, such as in a book, this is given by 'pp. 237-240' or 'p. 456' (see below).

References should be set out as follows:

Journal reference - Yang, Y., Dahly-Vernon, A.J., Blomme, E.A.G., Lai-Zhang, J., Kempf, D.J., Marsh, K.C., Harrington, Y.A., Nye, S.H., Evans, D.L., Roman, R.J. et al., 2010. Liver transcriptomic changes associated with ritonavir-induced hyperlipidemia in sensitive and resistant strains of rats. *The Veterinary Journal* 185, 75-82.

Book reference - Cunningham, J.C., Klein, B.G., 2007. Endocrinology. In: *Textbook of Veterinary Physiology*, Fourth Ed. Saunders Elsevier, St. Louis, MO, USA, pp. 439-448.

Proceedings - Elbers, A.R., Mintiens, K., Staubach, C., Gerbier, G., Meiswinkel, R., Hendrinckx, G., Backx, A., Conraths, F.J., Meroc, E., Ducheyne, E., et al., 2007. Bluetongue virus serotype 8 epidemic in North-western Europe in 2006: Preliminary findings. In: *Proceedings of the Annual Meeting of the Society for Veterinary Epidemiology and Preventive Medicine*, Dipoli, Finland, pp. 231-245.

Theses - Duz, M. 2009. Assessment of a methodology for determination of H₂O₂ concentration and pH in exhaled breath condensate in horses with and without lower airway inflammation. Thesis, Master of Veterinary Medicine, University of Glasgow.

Web addresses - FAOSTAT, 2008. Food and Agricultural Organization Statistical Database: Live Animals. <http://faostat.fao.org> (accessed 15 July 2010).

Tables. Each Table should be typed on a separate page, numbered (1, 2 etc.) and a brief title given directly above each table. Tables should be in portrait format. Footnotes to tables should be indicated by a, b etc. and typed at the bottom of the relevant table. Information in tables should not be duplicated in figures and vice versa. The tables should be placed at the end of the main text after the References but before the Figure Legends.

Figures. The quality of all Figures submitted must be high. The Editors will reject Figures of an unacceptable standard or ask the Authors to replace them. Figures should be referred to sequentially in the text as Fig. 1, Fig. 2, Figs. 3a,b and 4, etc. A Legend must be provided for each Figure and placed after any Tables in the main manuscript file. Do not write legends on the figures themselves. Scale bars must be provided on all photomicrographs and electron micrographs.

In preparing figures, Authors should note the following:

- Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.
- Save text in figures as "graphics" or enclose the font.
- Only use the following fonts in your figures: Times New Roman, Arial, Courier, Helvetica, Symbol.
- Number the figures according to their sequence in the text.
- Use a logical naming convention for your artwork files.
- Provide all figures as separate files.
- Produce images near to the desired size of the printed version.
- Ensure that all units and wording in the figures conform to TVJ style (see Units above).

Please note that each figure must be uploaded to the journal website separately and not included in the main manuscript.

Authors are encouraged to read the detailed guide on electronic artwork, which is available on our website: <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

Artwork formats

Regardless of the application used, when your electronic artwork is finalised, please 'save as' or convert the images to one of the following formats (Note the resolution requirements for line drawings, half-tones, and line/half-tone combinations given below):

EPS: Vector drawings. Embed the font or save the text as 'graphics'. TIFF: Colour or greyscale photographs (half-tones): Always use a minimum of 300 dpi. TIFF:

Bitmapped line drawings: Use a minimum of 1,000 dpi. TIFF: Combinations of bitmapped line/half-tone (colour or greyscale): A minimum of 500 dpi is required. DOC, XLS or PPT: If your electronic artwork is created in any of these Microsoft Office applications, please supply 'as is'.

Please do not:

- Supply embedded graphics in your word processor (spreadsheet, presentation) document.
- Supply files that are optimised for screen use (e.g. GIF, BMP, PICT, WPG); the resolution is too low.
- Supply files that are too low in resolution.
- Submit graphics that are disproportionately large for the content.

All Figures will be published in colour on-line, but colour will only be used in the hard copy of the Journal where it is considered to be essential to the presentation of the paper (colour reproduction charges may apply).

In preparing a manuscript for submission, Authors should note the following guidelines:

- Ensure that any files are not saved as 'read-only'.
- Use two carriage returns to end paragraphs.
- Type text without end of line hyphenation, except for compound words.
- Do not use lower case 'l' (lower case 'el') for 'one' or 'O' (upper case 'oh') for '0' (zero), since they have different typesetting values.
- Be consistent with punctuation and only insert a single space between words and after punctuation.

Preparation of supplementary data

Elsevier accepts electronic supplementary material to support and enhance your scientific research. For correct wording when referenced in the text, see above. Supplementary files offer the Author additional possibilities to publish supporting applications, movies, animation sequences, high-resolution images, background

data sets, sound clips and more. Supplementary files supplied will be published on-line alongside the electronic version of your article in Elsevier web products, including ScienceDirect: <http://www.sciencedirect.com/science/journal/10900233>. In order to ensure that your submitted material is directly usable, please ensure that data are provided in one of our recommended file formats. Authors should submit the material together with the article and supply a concise and descriptive caption for each file.

NB. All contributions are subject to editorial revision. The Editor's decision will be final.

Proofs

The corresponding Author will be advised by the Editor when the paper has been accepted for publication and it may then be cited as 'In press' with the doi.

One set of page proofs in PDF format will be sent by e-mail to the corresponding Author. Elsevier sends PDF proofs which can be annotated; for this you will need to download Adobe Reader XI, which is available free from <http://get.adobe.com/reader/>.

Instructions on how to annotate PDF files will accompany the proofs. The exact system requirements are given at the Adobe site: <http://www.adobe.com/products/reader/techspecs>.html. If you do not wish to use the PDF annotations function, you may list the corrections (including replies to the Query Form) and return to Elsevier in an e-mail. Please list your corrections, quoting the line number. If, for any reason, this is not possible, then mark the corrections and any other comments (including replies to the Query Form) on a printout of your proof and return by fax, or scan the pages and e-mail, or send by post. Please use this proof only for checking the typesetting, editing, completeness and correctness of the text, Tables and Figures. Significant changes to the article as accepted for publication will only be considered at this stage with permission from the Editor.

Elsevier will do everything possible to publish an accepted article quickly and accurately. Therefore, it is important to ensure that all author corrections are sent back to Elsevier in one communication; Authors should check proofs very carefully before replying, since inclusion of any subsequent corrections cannot be guaranteed. Proof reading is the responsibility of the authors, but final Editor corrections may also be incorporated at proof stage.

Once the final corrections have been made, Elsevier will aim to publish the paper electronically within 6-8 weeks. The paper will then be notified by allocated a doi number and, once online, the paper may be cited as 'published' using its unique doi number. The Corresponding author the publisher when the paper is available on-line and can check its status and doi number using The Veterinary Journal's website <http://www.elsevier.com/locate/tvjl> (click on View Articles and then Articles in Press). The hard copy version of The Veterinary Journal containing the paper will follow later, normally within 12 months of acceptance.

Copyright

If excerpts from other copyrighted works are included, the Author(s) must obtain written permission from the copyright owners and credit the source(s) in the article. Elsevier has preprinted forms for use by Authors in these cases: contact Elsevier's Rights Department: phone (USA) +1 215 239 3804 or (UK) or +44 1865 843830, e-mail healthpermissions@elsevier.com. Requests may also be completed online via the Elsevier homepage <http://www.elsevier.com/authors/author-rights-and-responsibilities#permissions>.

Material in unpublished letters and manuscripts is also protected and must not be published unless permission has been obtained.

Authors' rights

As an Author you (or your employer or institution) may do the following:

- Make copies (print or electronic) of the article for your own personal use, including for your own classroom teaching use.

- Make copies and distribute such copies (including through e-mail) of the article to research colleagues, for the personal use by such colleagues (but not commercially or systematically, e.g., via an e-mail list or list server).
- Post a pre-print version of the article on Internet websites, including electronic pre-print servers, and to retain indefinitely such a version on such servers or sites.
- Post a revised personal version of the final text of the article (to reflect changes made in the peer review and editing process) on your personal or institutional website or server, with a link to the journal homepage (on <http://www.elsevier.com/locate/tvj>).
- Present the article at a meeting or conference and to distribute copies of the article to the delegates attending such a meeting.
- For your employer, if the article is a 'work for hire', made within the scope of your employment, your employer may use all or part of the information in the article for other intra-company use (e.g. training).
- Retain patent and trademark rights and rights to any processes or procedures described in the article.
- Include the article in full or in part in a thesis or dissertation (provided that this is not to be published commercially).
- Use the article or any part thereof in a printed compilation of your works, such as collected writings or lecture notes (subsequent to publication of your article in the journal).
- Prepare other derivative works, to extend the article into book-length form, or otherwise to re-use portions or excerpts in other works, with full acknowledgement of its original publication in the journal.

Funding body agreements and policies

Elsevier has established agreements and developed policies to allow Authors who publish in Elsevier journals to comply with potential manuscript archiving requirements as specified as conditions of their grant awards. To learn more about existing agreements and policies please visit <http://www.elsevier.com/fundingbodies>.

Book reviews

Publishers or Authors wishing to have a book considered for review in The Veterinary Journal should first contact the Books Editor at tvj@aht.org.uk. Book reviews are published in electronic format only.

Author enquiries

For enquiries relating to the submission of articles (including electronic submission where available) please visit the journal's homepage at <http://www.elsevier.com/locate/tvj>. This also provides the facility to track accepted articles and set up e-mail alerts to inform you of when an article's status has changed.

Contact details for questions arising after acceptance of an article, especially those relating to proofs, are provided after registration of an article for publication.

Offprints

The Corresponding author will, at no cost, be provided with a PDF file of the article via e-mail. The PDF file is a watermarked version of the published article and includes a cover sheet with the journal cover image and a disclaimer outlining the terms and conditions of use.

The Veterinary Journal has no page charges.

Appendix

Reporting Guidelines

Reporting guidelines are available for a broad range of study designs and allow research to be critically evaluated. These guidelines have been designed by international scientific teams to promote the quality of research reporting and to ensure there is a transparent, accurate and complete account of the research. The guidelines are freely available and include the following:

1. Standards for the reporting of diagnostic accuracy studies (STARD)
<http://www.stardstatement.org>
 2. Standards for the reporting of observational studies in epidemiology (STROBE)
<http://www.strobe-statement.org>
 3. Outbreak investigation reports and intervention studies of nosocomial infection (ORION) <http://www.idrn.org/orion.php>
 4. Consolidated standards for reporting randomised clinical trials (CONSORT)
<http://www.consort-statement.org>
 5. Systematic reviews and meta-analyses (PRISMA) <http://www.prisma-statement.org>
 6. Randomised control trials for livestock and food safety (REFLECT)
<http://www.reflectstatement.org/statement>
 7. Enhancing the quality and transparency of health research (including good publication practice for pharmaceutical companies), economic evaluations and qualitative research (EQUATOR) <http://www.equator-network.org>
- For further information see The Veterinary Journal (2010) 184, 249-250 (view article).

CAPÍTULO IV

Considerações finais

Os resultados desta pesquisa demonstraram a presença das duas mutações avaliadas, c.5G>A no gene *PRCD* e c.115A>T no gene *COL4A4*, em uma população de cães da raça Cocker Spaniel Inglês criados no Brasil, sendo as frequências alélicas de 25,5% e 0,9%, respectivamente.

A menor frequência alélica da mutação associada a FN, provavelmente é justificada pelo fato de que animais homozigotos afetados venham a óbito, em sua maioria, ao redor dos 13 meses de idade, e raramente um animal é acasalado antes desse período, diminuindo a propagação do alelo mutado.

O fato de animais heterozigotos para ambas as mutações não apresentarem sintomas da doença também contribui para a propagação silenciosa do alelo mutado. Nesses casos a única maneira de se evitar acasalamentos com possibilidade de nascimento de filhotes afetados é a realização da genotipagem dos animais destinados a reprodução.

A disponibilidade dos testes genéticos para *prcd*-PRA e FN no Brasil, permite aos criadores e proprietários a adoção de medidas de orientação de acasalamentos e aos Médicos Veterinários o diagnóstico etiológico destas enfermidades, de modo mais acessível que os testes realizados fora do país.