

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

**MUTAÇÕES ASSOCIADAS À ATROFIA
PROGRESSIVA DA RETINA EM CÃES DA RAÇA
GOLDEN RETRIEVER NO BRASIL**

ANELIZE DE SOUZA TRECENTI SANTANA

Botucatu, SP

FEVEREIRO, 2022

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

**MUTAÇÕES ASSOCIADAS À ATROFIA
PROGRESSIVA DA RETINA EM CÃES DA RAÇA
GOLDEN RETRIEVER NO BRASIL**

ANELIZE DE SOUZA TRECENTI SANTANA

Tese apresentada ao
Programa de Pós-
graduação em Medicina
Veterinária para
obtenção do título de
Doutor.

Orientador: Prof. Dr.
José Paes de Oliveira
Filho

Botucatu, SP

FEVEREIRO, 2022

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÊC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Santana, Anelize de Souza Trecenti.

Mutações associadas à atrofia progressiva da retina em
cães da raça Golden retriever no Brasil / Anelize de Souza
Trecenti Santana. - Botucatu, 2022

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

Orientador: José Paes de Oliveira Filho
Capes: 50501062

1. Cães. 2. Retina - Doenças. 3. Doenças genéticas
inatas. 4. Análise de sequência de DNA.

Palavras-chave: Análise de sequência de DNA; Doenças da
retina; Doenças genéticas.

Nome do autor: Anelize de Souza Trecenti Santana

Título: MUTAÇÕES ASSOCIADAS À ATROFIA PROGRESSIVA DA RETINA
EM CÃES DA RAÇA GOLDEN RETRIEVER NO BRASIL

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr. José Paes de Oliveira Filho

Orientador

Departamento de Clínica Veterinária FMVZ - UNESP – Botucatu/SP

Prof. Dr. Diego José Zanzarini Delfiol

Membro

UFU- Universidade Federal de Uberlândia

Prof. Dr. Danilo Giorgi Abranches de Andrade

Departamento de Clínica Veterinária FMVZ - UNESP – Botucatu/SP

Prof. Dr. Victor José Rosseto

Pontifica Universidade Católica de Minas Gerais

Prof. Dr. Cesar Erineudo Tavares de Araújo

Centro Universitário Dr. Leão Sampaio - Unileão

Data de defesa : 18 de Fevereiro de 2022.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pois sem fé nada seria possível.

Aos familiares, principalmente meu pai Luiz Antonio Trecenti e minha mãe Sonia Cristina de Souza Trecenti por todo auxílio, amor, paciência e apoio durante o período da pós-graduação.

Ao meu marido Murilo Teixeira Santana por todo amor, paciência, companheirismo e apoio em todos os momentos.

A minha filha Flora que participou do final do projeto sempre me trazendo paz e força de vontade para lutar e jamais desistir.

Ao professor e orientador José Paes de Oliveira Filho pela oportunidade de execução desse trabalho e, sobretudo, pela amizade, apoio e confiança durante nossa convivência no período de mestrado e doutorado.

Aos professores Alexandre Secorun, João Pessoa Araújo Júnior e Diego José Zanzarini Delfiol por sempre estar me apoiando e dando oportunidades para evoluir.

Aos amigos pós-graduandos, Danilo Andrade, Larissa Rocha Andrade, Raíssa Oliveira Leite, Ana Luísa Holanda de Albuquerque, Campo Amor Vieira da Cunha Neto, César Erineudo Tavares de Araújo, Daiane de Jesus Rodrigues, Lukas Garrido Albertino, Mariana Herman, Marina Gonzales, Camila Malossi e Pamela Marson pela amizade e pelo apoio técnico e intelectual durante a realização deste estudo, principalmente ao Lukas Garrido e Giulia Gumiero Guiraldelli por toda ajuda e apoio essencial durante o projeto.

A todos os tutores que sederam amostras dos seus animais. E aos animais. Sem a colaboração dessas pessoas o trabalho não seria possível.

Aos profissionais do programa de pós-graduação em Medicina Veterinária da FMVZ - Unesp - Botucatu/SP, pelo auxílio prestado durante o curso de doutorado.

À Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - Unesp - Botucatu/SP, pelo apoio desta instituição para o desenvolvimento desta pesquisa.

À CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) e FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo) pelo auxílio à pesquisa, possibilitando sua execução.

A todos que contribuíram para que esse trabalho pudesse ser concluído.

SUMÁRIO

RESUMO	7
ABSTRACT	8
CAPÍTULO I	9
1. Introdução.....	10
2. Revisão de literatura	12
2.1.Importância das doenças genéticas em animais domésticos	12
2.2. Atrofia Progressiva da Retina (PRA)	13
2.3. A raça Golden Retriever	15
2.4. Mutações associadas a atrofia progressiva de retina em cães da raça Golden Retriever	15
3. Materiais e Métodos.....	18
4. Resultados.....	20
5. Discussão geral	22
6. Considerações finais.....	24
7. Referências bibliográficas	25
CAPÍTULO II	29
Trabalho científico	30
CAPÍTULO III	41
ANEXOS 1.....	42
ANEXO 2	46

TRECENTI-SANTANA, A. S. **Mutações associadas à atrofia progressiva da retina em cães da raça Golden retriever no Brasil**. Botucatu – SP, 2021. 46p. Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu.

RESUMO

A atrofia progressiva da retina (PRA) é uma enfermidade caracterizada por degeneração das células do tecido da retina, de evolução lenta e cuja sua etiologia no golden retriever envolve mutações em três genes diferentes descritos, *prcd*-PRA, *SLC4A3* e *TTC8*. Até o momento a prevalência das mutações associadas á Atrofia progressiva da retina (PRA) em cães da raça Golden Retriever (GR) não foi verificada no Brasil. O objetivo do estudo, foi avaliar a prevalência e frequência alélica das mutações GR_PRA1, GR_PRA2 e *prcd*-PRA em cães da raça Golden Retriever brasileiros. Para tanto, foram utilizadas 121 amostras de DNA purificados de sangue total ou de saliva de cães da raça Golden Retriever pertencentes de canis e de tutores brasileiros. Regiões do DNA, possivelmente contendo cada uma das mutações, foram amplificados por reação em cadeia da polimerase (PCR) e submetidos ao sequenciamento de Sanger. A genotipagem destes animais foi realizada utilizando os eletroferogramas obtidos nestes sequenciamentos e comparados à sequência nucleotídica dos três genes depositada no GenBankTM. Todos os animais avaliados no estudo foram identificados como *wild-type* (121/121 animais; 100%) para mutações GR_PRA1 e GR_PRA2, ou seja, não foram identificado animais heterozigotos e homozigotos nesta população. Para a mutação *prcd*-PRA, 118 animais (118/121 animais; 97%) foram *wild-type* e 3 animais (3/121 animais; 2,47%) heterozigotos para a mutação. Portanto, a disponibilização do teste genético para as mutações nos permitirá a orientação dos acasalamentos visando a a implantação de medidas de controle para esta enfermidade em cães da raça Golden Retriever no Brasil.

Palavras chave: análise de sequência de DNA; doenças da retina;doenças genéticas.

TRECENTI-SANTANA, A. S. **Mutations associated with progressive retinal atrophy in golden retriever dogs in Brazil.** Botucatu – SP, 2022. 46p. Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu.

ABSTRACT

Progressive retinal atrophy (PRA) is a disease characterized by degeneration of retinal tissue cells, of slow evolution and whose etiology in the golden retriever involves mutations in three different genes described, *prcd*-PRA, SLC4A3 and TTC8. In addition, the lack of clinical knowledge of some of these diseases and, some occasions, the unavailability of the confirmatory genetic test can be an obstacle to the Veterinarian. The prevalence of mutations responsible for Progressive Retinal Atrophy (PRA) in Golden Retriever dogs has not been verified in Brazil, so this study aimed to evaluate the prevalence of GRPRA1, GRPRA2, and *prcd*-PRA, mutations in Brazilian golden retriever. For this purpose, 121 DNA sample obtained from blood and saliva samples of Golden Retriever dogs from Brazilian kennels or non- commercial owners were used. DNA fragments, containing each of the mutations, were amplified by polymerase chain reaction (PCR) and submitted to Sanger sequencing. The genotypes of these animals were analyzed using the electropherograms obtained in these sequences and compared to the nucleotide sequence of the three genes deposited in GenBank™. All animals evaluated in the study have been identified as wild type (121/121 animals; 100%) for GR_PRA1 and GR_PRA2 mutations, that is, non-carrier or homozygous animals were identified in this population. For the *prcd*-PRA mutation, 118 animals (118/121 animals; 97%) were wild type and three animals (3/121 animals; 2,47%) were heterozygous for the mutation. Therefore, the discovery of mutations will allow us to guide the mating to reduce clinical cases of the disease and, if necessary, the implementation of control measures for these diseases in Golden Retriever dogs in Brazil.

Keywords: DNA sequence analysis; genetic diseases, retinal disease

CAPÍTULO I

1. Introdução

A atrofia progressiva da retina (PRA) é uma enfermidade de evolução lenta, caracterizada por degeneração de células do tecido da retina, que é iniciada pela perda da resposta de fotorreceptores de bastonetes, seguida pelo mesmo processo em cones (PARRY, 1953). Assim, os primeiros sinais clínicos são a perda da visão noturna e visão periférica, que podem passar despercebidas pelo tutor. No entanto, com a progressão da doença, o cão começa a demonstrar perdas de visão diurna e central, podendo perder totalmente a visão ao longo do tempo.

Embora os sinais clínicos possam iniciar em diferentes idades, a PRA é uma doença de cães adultos, usualmente diagnosticada em torno dos cinco anos de idade. Entretanto, o processo de degeneração pode iniciar por volta dos três anos, mas o diagnóstico é tardio, já que é difícil para o tutor perceber a diminuição da visão noturna. Inicialmente, alguns sinais clínicos que o cão apresenta são olhos mais brilhantes e pupilas dilatadas (PATTERSON, 2000; SLATTER, 2005).

A PRA tem sido dividida em várias formas, de acordo com a idade de início, da doença, características patológicas e presença de diferentes mutações. Uma destas formas é denominada PRCD (*Progressive rod-cone degeneration*) (MIYADERA, 2012), causada pela mutação c.5G>A (p.Cys1Tyr) no gene codificante de *photoreceptor disc componente* (PRCD). Esta é a mutação causadora de PRA mais frequente em mais de 29 raças de cães (DOWNS et al., 2014a). Em muitas raças a mutação causadora de PRCD é a única mutação identificada até o presente momento e sua detecção vem sendo utilizada em diversos países como forma de seleção de acasalamentos, com o objetivo de diminuir sua frequência. Em alguns países europeus, a entrada de um animal como reprodutor de um plantel só pode ocorrer após a realização do teste genético para *prcd*-PRA (ZANGER et al., 2006).

Enquanto a mutação em *prcd*-PRA corresponde pela grande maioria dos casos em algumas raças, em outras, esta mutação é tão rara que sua avaliação não é relevante, pois irá demonstrar animais homozigotos normais na grande maioria dos animais testados. Uma das raças em que esta situação parece ocorrer é a Golden Retriever (DOWNS et al., 2014a). Além da mutação *prcd*-PRA, foram descritas outras duas mutações na raça e em genes diferentes: GR_PRA1 no

gene *solute carrier family 4 member 3* (SLC4A3) e GR_PRA 2 no gene *tetratricopeptide repeat domain 8* (TTC8) (DOWNS et al., 2014b). Não há estudos sobre as mutações na raça Golden Retriever (GR) no Brasil, sendo este o primeiro trabalho a avaliar a prevalência das mutações dessa raça.

2. Revisão de literatura

2.1. Importância das doenças genéticas em animais domésticos

Segundo Vila et al. (1997), os cães são considerados os primeiros mamíferos a se relacionar com os seres humanos há mais de 15 mil anos e, desde então, são selecionados de acordo com suas características morfológicas e comportamentais, desempenhando funções como caça, pastoreio, guarda ou simplesmente companhia. Estima-se que existam cerca de 700 raças caninas conhecidas e as quais foram criadas e desenvolvidas desde o século XIX com o auxílio dos clubes de raças, que identificam os padrões ideais para cada uma delas visando o registro das progênies (PARKER et al., 2004).

Os cruzamentos das raças de forma seletiva, no qual seus padreadores populares se mantêm, conhecido como *inbreeding*, auxilia na fixação de características desejáveis, porém, contribuir para diminuição da variabilidade genética de cada raça (BELLUMORI, 2013), ao perpetuar um defeito gênico. As doenças genéticas por sua vez, ocorrem devido a mutações que podem ser classificadas como substituição, deleção ou inserção e controlada por um único gene (monogênica) ou por vários (poligênicas). As monogênicas são conhecidas como mendeliana e podem ser herdadas de forma autossômica recessiva, quando apresenta duas cópias do alelo mutado e autossômica dominante, quando apenas um alelo mutado pode gerar sinais clínicos. Na forma autossômica recessiva, como os animais heterozigotos não apresentam sinais clínicos, o alelo mutado vai se perpetuando silenciosamente até o aparecimento de um animal homozigoto recessivo (SUMMERS, et al., 2010). O conhecimento das doenças genéticas e suas formas são importantes para a criação e reprodução dos animais. Uma vez que testes genéticos detectam determinada mutação servindo de guia ao acasalamento e diminuindo a incidência de novos animais afetados.

Dentre os grupos de doenças genéticas em cães, as doenças de mais ascensão são as oculares, provavelmente devido a facilidade de avaliar o olho por técnicas menos invasivas (MELLERSH, 2014). Afim de controlar a disseminação dessas enfermidades, muitos clubes de raças caninos em diversos países exigem a triagem oftalmológica para doenças hereditárias antes que um animal entre na

reprodução. As doenças de retina e as da lente são as mais prevalentes segundo o *Online Mendelian Inheritance in Animal Database* (OMIA, 2008).

2.2. Atrofia Progressiva da Retina (PRA)

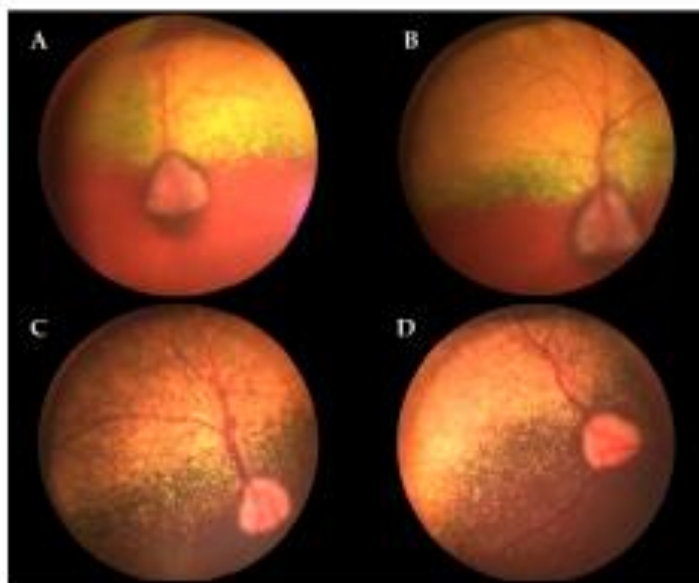
A atrofia progressiva da retina (PRA) foi descrita pela primeira vez em um poodle miniatura e mais de 50 raças apresentaram a mutação *prcd-PRA* (OptiGen, 2018). É uma doença genética, de caráter autossômico recessivo (MIYADERA et al., 2012). Resulta em perda progressiva da função retiniana externa e morte dos fotorreceptores bilateralmente, tendendo à simetria e sem predisposição sexual (BEDFORD, 2005). Outras causas de atrofia progressiva da retina podem estar relacionadas à deficiência nutricional, glaucoma, inflamação, isquemia e toxinas (MILLICHAMP, 1990). A nictalopia (cegueira noturna) é o primeiro sinal observado, uma vez que há o acometimento inicial de bastonetes e posteriormente de cones, que culmina em cegueira diurna (KARLSTAM et al., 2011; NARFSTRÖM et al., 2011).

Outras alterações observadas ao exame clínico estão relacionadas aos reflexos pupilares, que se tornam lentos à luz, mas podem estar presentes até determinado grau da doença, inclusive em estágios avançados (YOGO et al., 2011). A perda da visão, em geral, é acelerada pela presença de catarata secundária (MAEHARA et al., 2007). As alterações iniciais surgem nas áreas corticais posteriores do cristalino, evoluindo para opacidade total (BEDFORD, 2005).

O diagnóstico pode ser realizado por exames de fundo de olho (Fundoscopia) na figura 1. 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).

E por eletrorretinograma (ERG) que 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. E 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 (SAFATLE et al., 2010; GELATT, 2013). Porém, por se tratar de uma doença hereditária, a detecção precoce por meio de técnicas moleculares permite a adoção de medidas de controle e orientação de acasalamento, visando a redução de casos clínicos. Uma vez que, animais em homozigose são assintomáticos até o início da idade reprodutiva (DAVE e DAVE, 2014).



Fonte: Andrade, L.R. et. al, 2019.

Figura 1: Fundoscopia de dois animais da raça Cocker Spaniel inglês. **A e B.** Atenuação dos vasos da retina **A.** Olho direito e **B** olho esquerdo de um animal homozigoto mutado. **C.** olho direito e **D.** olho esquerdo de um animal *wild-type* (não mutado) com fundo tapetal não alterado.

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 detecta-la tanto em homozigose quanto em heterozigose. O resultado permite a separação de cães em três grupos: homozigoto normal ou *wild type*, onde não apresenta nenhum alelo mutado; heterozigoto, em que apresenta um alelo multado e outro normal e não manifestara sinais clínicos da doença, mas pode produzir animais afetados se acasalado com outro cão heterozigoto. E homozigoto mutante ou afetado, que apresenta dois alelos mutados, são aqueles que desenvolvem a PRA. Sendo assim um diagnóstico preciso para a enfermidade (ANDRADE, 2019).

E por se tratar de uma doença hereditária, seu tratamento, irá prevenir ou retardar a progressão da degeneração retiniana. Mesmo que controverso, este consiste em aplicação de suplementos vitamínicos, antioxidante como vitamina C e E, carotenóides, ácidos graxos e zinco (GOMES et al., 2013).

2.3. A raça Golden Retriever

A raça Golden Retriever foi desenvolvida na Escócia, com o objetivo de criar um animal com boa habilidade na caça de aves aquáticas, com um olfato aguçado e um ótimo temperamento. A raça, portanto, possui três tipos de linhagens de sangue diferentes, que resulta em cães distintos, normalmente com as cores e os tamanhos diferentes para cada tipo. Sendo eles o britânico, americano e canadense (CBKC, 2021). O Golden Retriever britânico ou English Creado Golden Retriever possui o focinho mais largo e curto, além de terem as pernas mais curtas. Eles são mais claros, e vem de linhagens de sangue específico da Europa, são mais comuns na Inglaterra. Já a linhagem americana é menos encorpada que o britânico. E é considerado o mais procurado por criadores brasileiros, ele possui uma cor mais dourada. Enquanto o canadense possui a pelagem mais clara de um creme branco, é muito prevalente na Europa, resultando em animais mais fortes e pesados (CBKC, 2021).

O Golden Retriever é uma das raças com maior ascensão no Brasil nos últimos anos, sendo atualmente o 1º colocado em número de registros dentre cães de grande porte (CBGR, 2021). É um animal de aparência robusta e com características muito procurada pelos tutores, por ter seu temperamento tranquilo, ser muito amigável e companheiro. Segundo a Confederação Brasileira de Cinofilia (CBKC), somente no ano de 2019, 4.701 animais foram registrados em órgãos filiados (CBKC, 2021).

2.4. Mutações associadas a atrofia progressiva de retina em cães da raça Golden Retriever

Apesar de poucos trabalhos terem investigado PRA em animais da raça Golden Retriever, até o momento estes dados parecem indicar que a mutação *prcd*-PRA é bastante rara na raça, demonstrando que o exame de DNA focando

apenas nesta mutação não é o mais adequado. Segundo dados do laboratório Optigen (Optigen, 2008) o número de animais dessa raça com diagnóstico de PRA que foram homozigotos para a mutação em *prcd*-PRA é mínimo (0,05%). Em 2011, um estudo na Europa, investigou animais com diagnóstico clínico de PRA homozigotos selvagens para o gene PRCD e identificou uma segunda mutação, que até o momento foi descrita apenas nesta raça (DOWNS et al., 2011). Esta mutação, denominada de PRA_1, no gene *SLC4A3*, codificante de uma proteína transportadora de ânions expressa na retina, cuja inserção de uma citosina na posição 2.601, causa um erro na fase de leitura do gene. Este trabalho determinou que apesar da baixa frequência da mutação na população em geral (até 6%) mais de 60% dos animais com diagnóstico clínico de PRA foram portadores desta mutação, especialmente dentre os cães de origem Européia. No entanto, somente sete animais de origem norte americana foram investigados, o que não permite fazer nenhum tipo de inferência sobre a raça na América (DOWNS et al., 2014a).

Em 2014 um segundo trabalho do mesmo grupo avaliou uma amostra maior de cães da raça Golden Retriever em uma tentativa de determinar qual mutação estaria relacionada aos mais de 30% de casos de PRA que não puderam ser explicados pelas mutações *prcd*-PRA e PRA_1. Este grupo determinou que uma deleção de uma adenina na posição 669 do gene *TTC8*, causando um *stop códon* prematuro, seria a responsável por mais de 76% dos casos da doença em cães sem as mutações nos genes PRCD e PRA_1 (DOWNS et al., 2014b).

Assim, diante dos poucos dados existentes em populações de outros países, aparentemente três mutações, todas recessivas e com penetrância completa, são causadoras da atrofia progressiva da retina no Golden Retriever, *SLC4A3* (GR_PRA 1), *TTC8* (GR_PRA 2) e *prcd*-PRA e explicam a maioria dos casos. No entanto, a aplicação deste conhecimento para a seleção de animais reprodutores e realização de cruzamentos controlados só é possível após a determinação das mutações comuns na população brasileira, especialmente para uma doença com grande heterogeneidade genética como a atrofia progressiva da retina.

Mesmo existindo poucos trabalhos que investigam a PRA na raça Golden Retriever, este estudo tem por objetivo determinar a frequência alélica das mutações no Brasil, que se faz importante para identificar, a população afetada e tornar disponível os testes genéticos como diagnóstico definitivo. Afim de orientar

a seleção de animais durante a reprodução , reduzir casos clínicos da doença e sugerir medidas de controle para criadores da raça.

3. 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 - 0205/2017).

O tamanho amostral foi calculado utilizando-se o software OpenEpi (versão online 3.01) e considerando o intervalo de confiança de 95%, margem de erro de 5%, o número de cães Golden Retriever registrados na Confederação Brasileira de Cinofilia (CBKC) nos últimos cinco anos (1.415 animais) e a frequência alélica da mutação *PRCD-pra* 0,05% (GRCA, 2005). Entretanto, optou-se em utilizar 121 animais da raça Golden Retriever.

Um questionário foi aplicado para caracterizar o animal, de acordo com informações do pedigree, sexo, idade e sinais clínicos de perda de visão. O questionário também avaliou o conhecimento dos proprietários com relação as mutações associadas a PRA.

Amostras de sangue total e/ou saliva foram coletadas dos animais e o DNA genômico foi extraído com o kit ReliaPrep™ Blood gDNA Miniprep System (Promega®, Madison, WI, USA), de acordo com as recomendações do fabricante. As amostras foram acondicionadas em freezer -20°C até a realização da técnica de PCR.

Foram desenvolvidos primers específicos para os pontos de mutação utilizando ferramentas online (Primer Express™ - Applied Biosystem e BLAST® - Basic Local Alignment Search Tool) e estão descritos na tabela 1.

Tabela 1. Primers desenvolvidos para as mutações GR_PRA1, GR_PRA2 e *prcd*-PRA e tamanho dos produtos amplificados.

Sequências de Primers	Tamanho do produto amplificado
<i>GR_PRA1</i>	
F 5'GTAGTTGGATGTCGTGGAATACT3'	473 bp
R 5'CCGGCCTGATTAAACCTCTT3'	

<i>GR_PRA2</i>	
F 5'CTCTGGTCTGGAACCGATTATTT3'	493 bp
R 5'GGATCTGAAGGTGCAGATT3'	
<i>prcd-PRA</i>	
F 5'CCAGTGGCAGCAGGAACC3'	512 bp
R 5'CCGACCTGCTGCCCCACGACTG3'	

PCR para GR_PRA1 e GR_PRA2 foram realizadas com um volume total de 25 µL, onde 12,5 µL de GoTaq® Green PCR Master Mix (Promega®, Madison, WI, USA), 8,5 µL água nuclease-free, 300 nM de cada um dos primers e 2,5 µL de DNA. Além disso, uma reação controle foi utilizada para verificar possível contaminação da PCR. As condições de amplificação foram de 95°C por 5 minutos, seguido de 40 ciclos de 95°C por 15 segundos, 60°C por 35 segundos, 72°C por 30 segundos e extensão final de 72°C por 1 minuto. Amplicons foram avaliados por eletroforese em gel de agarose 1,5%, purificados com a técnica de *beads* magnéticas e sequenciados por sequenciamento direto de Sanger.

Para a mutação *prcd-PRA* foram padronizadas reações de PCR para um volume total de 25 µL, onde 12,5 µL de GoTaq® Green PCR Master Mix (Promega®, Madison, WI, USA), 8,5 µL água nuclease-free, 300 nM de cada um dos primers e 2,5 µL de DNA. Além disso, uma reação controle foi utilizada para verificar possível contaminação da PCR. As condições de amplificação eram 95°C por 5 minutos, seguido de 35 ciclos de 95°C por 45 segundos, 62°C por 35 segundos, 72°C por 35 segundos e extensão final de 72°C por 5 minutos. Amplicons foram avaliados por eletroforese em gel de agarose 1,5%, purificados com a técnica de *beads* magnéticas e sequenciados por sequenciamento direto de Sanger.

As sequências e eletroferogramas obtidos foram analisados com Sequencher™ (Gene Code Corporation).

4. Resultados

Das 121 amostras de DNA de Golden Retriever (n= 66 fêmeas e n= 55 machos) utilizadas neste estudo. Essas amostras foram obtidas de proprietários e canis (n= 113 amostras) e do banco de dados do Laboratório de Biologia Molecular da Clínica Veterinária (LBMCV) (n= 8 amostras) da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (FMVZ – UNESP), campus Botucatu. As amostras de DNA foram acondicionadas em freezer -20°C até a realização da técnica de PCR e foram obtidas de sangue total (n= 34 amostras) e saliva (n= 87 amostras).

Aproximadamente 10,74% (13/121 animais) tinham menos que um ano de idade, 6,61% (8/121 animais) um ano de idade, 14,87% (18/121 animais) dois anos de idade, 19,83% (24/121 animais) três anos de idade, 14,04% (17/121 animais) quatro anos de idade e 33,88% (41/121 animais) cinco anos ou mais.

Cinco animais (5/121 animais; 4,13%) apresentaram enfermidades oculares previamente, que foram diagnosticadas por um Médico Veterinário, como entrópio (2 animais; 40%), ceratoconjuntivite seca (1 animal; 20%), úlcera de córnea (1 animal; 40%) e cegueira bilateral (1 animal; 20%). 87,60% (106/121 proprietários) dos proprietários não sabia se outro animal da ninhada de seu cão apresentava problemas ocular, e apenas 16,5% (20/121 de tutores) tinham o conhecimento sobre a PRA em cães da raça Golden Retriever.

As amostras pertencentes ao LBMCV não possuíam histórico clínico e não foram avaliadas de acordo com o questionário.

De acordo com as sequências e eletroferogramas obtidos, todos os animais analisados neste estudo (n= 121 animais) foram classificados como *wild-type* para as mutações GR_PRA1 (121/121 animais; 100%) e GR_PRA2 (121/121 animais; 100%), ou seja, nenhum animal heterozigoto ou homozigotos foi observado nesta população. Para a mutação *prcd*-PRA, 118 animais (118/121 animais; 97,52%) foram classificados como *wild-type* e três animais (3/121 animais; 2,47%) foram classificados como heterozigotos (carreadores) para a mutação (Figura 2). Portanto, a frequência alélica da mutação encontrada no presente estudo, foi de 1,23%.

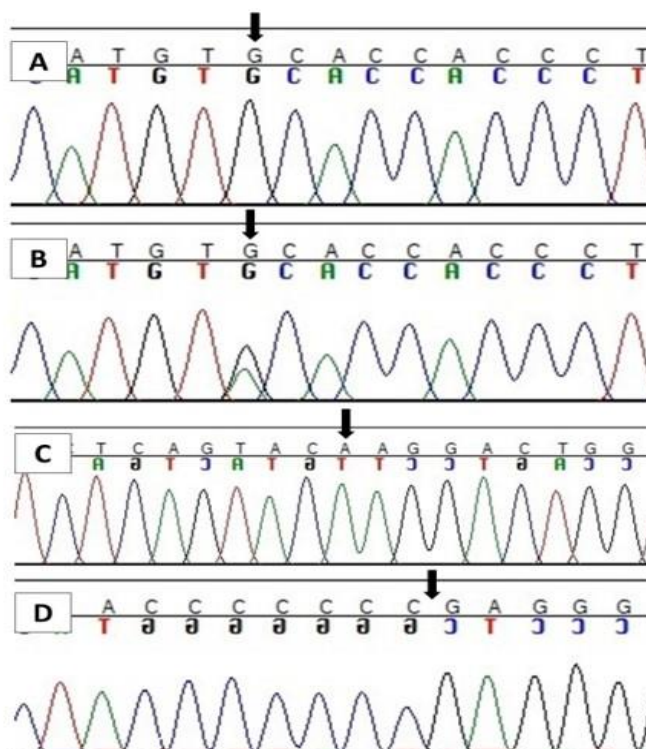


Figura 2. Eletroferogramas obtidos de **(A)** animal *wild-type* para mutação *prcd*-PRA, **(B)** animal heterozigoto para mutação *prcd*-PRA, **(C)** animal *wild-type* para mutação GR_PRA2, and **(D)** animal *wild-type* para mutação GR_PRA1. Setas pretas representam os pontos de **(A; B)** substituição (g.4188663G>A; *prcd*-PRA), **(C)** deleção (g.63129154delA; GR_PRA2), e **(D)** inserção (c.2601_2602insC; GR_PRA1).

5. Discussão geral

Este é o primeiro estudo a avaliar a frequência alélica das mutações GR_PRA1, GR_PRA2 e *prcd*-PRA em cães da raça Golden Retriever no Brasil. Apesar destas mutações não serem descritas no Brasil, estudos realizados em outros países contribuíram para definir a importância dessas mutações na raça (DOWNS et al., 2011; DOWNS et al., 2014) assim como modelos para estudos em humanos (ZANGERL et al., 2006; DOWNS et al., 2011; DOWNS et al., 2014).

Um total de 121 amostras de DNA de GR (n= 64 fêmeas e n= 51 machos) foram analisadas. Todos os animais avaliados no estudo foram identificados como *wild-type* (121/121 animais; 100%) para mutações GR_PRA1 e GR_PRA2, ou seja, animais não foram identificados animais carreadores ou homozigotos nesta população. Para a mutação *prcd*-PRA, 118 animais (118/121 animais; 97,52%) foram classificados como *wild-type* e três animais (3/121 animais; 2,47% p=1,11%) como heterozigotos (carreadores) para a mutação, portanto, a frequência alélica encontrada no estudo foi de 1,23%. Demonstrando que mesmo com rara prevalência, ela está presente em algumas linhagens e animais no Brasil.

Cinco animais (5/121 animais; 4,13%) apresentaram enfermidades oculares previamente, que foram diagnosticadas por um Médico Veterinário, como entrópico (2 animais; 40%), ceratoconjuntivite seca (1 animal; 20%), úlcera de córnea (1 animal; 40%) e cegueira bilateral (1 animal; 20%). 87,60% (106/121 dos tutores) não sabiam se outro animal da ninhada de seu cão apresentava problemas ocular, e 16,5% (20/121 tutores) tinham conhecimento sobre a PRA em cães da raça Golden Retriever. Os relatos de mutação *prcd*-PRA na raça GR são raros (GRCA; GRC; OPTIGEN; Downs et al., 2011). De acordo com o *Golden Retriever Club of America* (GRCA), a prevalência dessa mutação na raça de 1990 a 1999 foi de 0,05% (21 animais homozigotos) e em 2000 a 2005 de 0,05%. Após 2007, com o conhecimento das mutações que causam a PRA e a introdução dos testes genéticos comerciais, nenhum gene causador da PRA foi encontrado na raça (GRCA, 2021). E, de acordo com o *Golden Retriever Club* (GRC), essa mutação está virtualmente eliminada da população no Reino Unido, mas nenhum dado foi apresentado.

Downs e colaboradores (2011), testaram 80 cães GR para a mutação *prcd-PRA* e encontraram um animal heterozigoto (1/80 animais; 1,25%) entre eles. A frequência alélica observada pelos autores é a mesma quando comparada à nossa (1,25% versus 1,23%), e ambos os estudos demonstram que é rara a ocorrência da mutação na raça no Brasil e em outros países e sugere que o teste focando nesse locus não é o mais informativo (OPTIGEN). No mesmo estudo, Downs e colaboradores (2011) também descreveram outra mutação denominada GR_PRA1, associada à raça GR que causa PRA. Os autores testaram 945 animais para essa mutação e observaram uma prevalência de 56,3% homozigotos, 87,2% heterozigotos. A frequência alélica de GR_PRA1 para GR do Reino Unido (UK) foi de 4%, na Suécia de 6%, 2% na França (DOWNS et al., 2011) e 0,5% para os Estados Unidos (EUA) (GRCA, 2021).

Os mesmos autores descreveram outra mutação associada à raça GR que causa PRA, denominada GR_PRA2. Testaram 2.500 cães da raça GR e foi observada uma prevalência de 3,5% heterozigotos e 96,5% *wild type*. Nenhum animal homozigoto foi observado no estudo. A frequência alélica observada no estudo de GR_PRA2 para GR do Reino Unido foi de 0,01%, para a Suécia 0,04%, para a Dinamarca 0,04%, para a França 0,03% e para os EUA 0,01% (DOWNS et al., 2014).

De acordo com o CBGR (Conselho Brasileiro da Raça Golden Retriever), a genética brasileira do GR é composta por várias linhagens sanguíneas, principalmente as dos EUA. Isso pode explicar nossos resultados observados neste estudo para mutações GR_PRA1 e GR_PRA2 (100% *wild type*; 121/121 animais), em que nenhum animal heterozigoto e homozigoto foi encontrado, uma vez que a prevalência dessas mutações nessas linhagens são raras, de 0,5% para GR_PRA1 (GRCA) e 0,01% para GR_PRA2 (DOWNS et al., 2014).

6. Considerações finais

As frequências alélicas para as mutações responsáveis por GR_PRA1 e GR_PRA2 na raça Golden Retriever, não foram detectadas na população brasileira. Três animais foram classificados como heterozigotos para a mutação *prcd*-PRA (2,47%; $p=1,11\%$), a frequência alelica encontrada no estudo, por sua vez, foi de 1,23%. Demonstrando que, mesmo que rara a mutação está presente em algumas linhagens e em animais brasileiros. Portanto, são necessárias medidas de controle com base em seleção de acasalamentos utilizando testes genéticos, uma vez que os mesmos foram padronizados e são encontrados comercialmente no país, afim de minimizar futuramente possíveis nascimentos de animais afetados.

7. Referências bibliográficas

AGUIRRE-HERNÁNDEZ, J. et al. **The finnish lapphund retinal atrophy locus maps to the centromeric region of CFA9**. BMC Vet Res, n.3, p.14, 2007.

ANDRADE, L.R., CARCERES, A.M., TRECENTI, A.S., BRANDÃO, C.V.S., GANDOLFI, M.G., AGUIAR, E.V., ANDRADE, D.G.A., BORGES, A.S., OLIVEIRA-FILHO, J.P. **Allele Frequency of the C.5G>A Mutation in the PRCD Gene Responsible for Progressive Retinal Atrophy in English Cocker Spaniel Dogs**. *Animals*. 9(10):884. 2019. doi: <https://doi.org/10.3390/ani9100844>.

BEDFORD, P.G. **Agonioscopic 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.

BEDFORD, P.G.C. **Progressive retinal atrophy in dogs**. Vet Record, v.156, n.4, p.124, 2005.

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.

CONFEDERAÇÃO BRASILEIRA DE CINOFILIA (CBKC). Disponível em<<http://cbkc.org/cbkc/estatisticas>> Acesso em 10 de Agosto de 2017.

CONSELHO BRASILEIRO DA RAÇA GOLDEN RETRIVER (CBGR). Available in:<<https://www.cbrgoldenretriever.com.br/?fbclid=IwAR1unTFjoT7MrmHfK-j5nYi0a4FG3VMgvyuqD4tn8za6P2X65V8bWd9HTw>>. Acesso em 27 de Julho de 2021

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

DOWNS LM et al **A Frameshift Mutation in Golden Retriever Dogs with Progressive Retinal Atrophy Endorses SLC4A3 as a Candidate Gene for Human Retinal Degenerations.** PLoS ONE, 6(6): e21452. 2011.

DOWNS LM et al. **Genetic screening for PRA-associated mutations in multiple dog] breeds shows that PRA is heterogeneous within and between breeds.** Veterinary Ophthalmology 17(2): 126–130. 2014a.

DOWNS LM et al. **A novel mutation in TTC8 is associated with progressive retinal atrophy in the golden retriever.** Canine Genetics and Epidemiology, 1:4. 2014b.

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

GOLDEN RETRIEVER CLUB OF AMERICA (GRCA). Available in: < <https://grca.org/about-the-breed/health-research/>>. Acesso em 27 de Julho de 2021.

KARLSTAM, L. et al. **A slowly progressive retinopathy in the Shetland Sheepdog.** Vet Ophthalmol, v.14, n.4, p.227-238, 2011

LEWIS, T.W.; MELLERSH, C.S. **Changes in mutation frequency of eight Mendelian inherited disorders in eight pedigree dog populations following introduction of a comercial DNA test.** PLoS One. 14(1):e0209864. 2011.

MAEHARA, S. et al. **The effects of cataract stage, lens-induced uveitis and cataract removal on ERG in dogs with cataract.** Vet Ophthalmol, v.10, n.5, p.308-312, 2007.

MELLERSH CS. **The genetics of eye disorders in the dog.** Canine Genet and Epidemiol 2014;1(3).

MILLICHAMP, N.J. **Retinal degeneration in the dog and cat.** Vet Clin North

Am: Small Anim Pract, v.20, n.3, p.799-835, 1990.

MIYADERA K . **Genetic and phenotypic variations of inherited retinal diseases in dogs: the power of within- and across-breed studies.** Mammalian Genome, 23:40–61. 2012.

NARFSTROM 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.

ONLINE MENDELIAN INHERITANCE IN ANIMAL DATABASE (OMIA). Disponível em: <<http://omia.org/home/>> Acesso em 12 de julho de 2021.

OPTIGEN. *prcd*-PRA in Golden Retrievers. Available in: <http://www.optigen.com/opt9_pra_goldenrtvr.html>. 2008. Acesso em 20 de Agosto de 2021.

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.

PARRY, H.B. **Degenerations of the dog retina. II. Generalized progressive atrophy of hereditary origin.** British. Journal of Ophthalmology 37: 487–502. 1953.

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.

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 GOLDEN RETRIEVER CLUB (GRC). Available in:
<<https://thegoldenretrieverclub.co.uk/>>. Acesso em 27 de Julho de 2021

TUNTIVANICH, N. et al. **Characterization of a canine modelo f autosomal recessive retinitis pigmentosa due to a PDE6A mutation**. IOVS, v.50, n.2, p.801-813, 2009.

VILA, 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.; TERAKADO, 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*. 88(5):551 63. 2006.

CAPÍTULO II



Allele Frequency of SLC4A3 (PRA1), TTC8 (PRA2), and PRA-prcd Mutations in Golden Retrievers in Brazil

Anelize S. Trecenti¹, Giulia G. Guiraldelli¹, Lukas Albertino¹, Julia F. Ferreira¹, Fabiana M. Andrade², Alexandre Borges¹, Jose P. Oliveira-Filho³, ^{1*}

¹São Paulo State University (UNESP), School of Veterinary Medicine and Animal Science, Brazil, ²School of Agronomy, Zootechnics Department, Federal University of Rio Grande do Sul, Brazil, ³São Paulo State University, Brazil

Submitted to Journal:

Frontiers in Veterinary Science

Specialty Section:

Comparative and Clinical Medicine

Article type:

Brief Research Report Article

Manuscript ID:

973854

Received on:

20 Jun 2022

Journal website link:

www.frontiersin.org

Conflict of interest statement

The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest

Author contribution statement

AST, JPOF, and FM contributed to the conception and design of the study. AST, GGG, LGA, JFF, MLP, and FM contributed to the sample collection. AST, GGG, LGA, and JFF contributed to sample processing. AST, LGA, ASB, and JPOF contributed to writing the first drafts of the manuscript. JPOF contributed to directing the project. All authors contributed to manuscript revision and read and approved the submitted version.

Keywords

Canine PRA, DNA sequence analysis, genetic disease, Loss of vision, Prevalence Study, Retinal disease

Abstract

Word count: 178

Progressive retinal atrophy (PRA) is a term used in veterinary medicine to describe inherited and progressive retinal diseases characterized by progressive retinal degeneration and loss of vision. In the Golden Retriever (GR) breed, the mutations associated with PRA have an autosomal recessive inheritance pattern. This study aimed to verify the allele frequency of PRA1, PRA2, and

PRA-prcd in the GR breed in Brazil. A total of 121 GR DNA samples (n= 66 females and n= 55 males) were analysed. All animals assessed in this study were identified as wild-type (121/121 animals; 100%) for PRA1 and PRA2 mutations; therefore, no carrier or homozygous animals were identified in this population. For the PRA-prcd mutation, 118 animals (118/121 animals; 97.52%) were wild-type. Three animals were genotyped as heterozygous for PRA-prcd (3/121 animals; 2.47%; $p= 1.23\%$), demonstrating that this mutation is still present in some bloodlines and animals in Brazil, even with a rare prevalence. In addition, the vast majority (98.3%) of Brazilian breeders assessed in this study were unaware of these mutations as a cause of blindness in the Golden Retriever.

Contribution to the field

Progressive retinal atrophy is a term used in veterinary medicine to describe inherited and progressive retinal diseases characterized by progressive retinal degeneration and loss of vision. In the Golden Retriever breed, the mutations associated with PRA have an autosomal recessive inheritance pattern, i.e., PRA1, PRA2, and PRA-prcd. Once the allele frequencies can change among populations and canine Brazilian populations were never studied for these mutations, this study aimed to verify the allele frequency of PRA1, PRA2, and PRA-prcd in the GR breed in Brazil. No dogs were observed with PRA1 or PRA2 allele mutant, while three animals were genotyped

as heterozygous for PRA-prcd, demonstrating that this mutation is still present in some bloodlines and animals in Brazil, even with a rare prevalence. In addition, the vast majority (98.3%) of Brazilian breeders assessed in this study were unaware of these mutations as a cause of blindness in the Golden Retriever.

Ethics statements

Studies involving animal subjects

Generated Statement: The animal study was reviewed and approved by Institutional Animal Care and Use Committee from School of Veterinary Medicine and Animal Science. Written informed consent was obtained from the owners for the participation of their animals in this study.

Studies involving human subjects

Generated Statement: No human studies are presented in this manuscript.

Inclusion of identifiable human data

Generated Statement: No potentially identifiable human images or data is presented in this study.

Data availability statement

Generated Statement: The authors acknowledge that the data presented in this study must be deposited and made publicly available in an acceptable repository, prior to publication. Frontiers cannot accept a manuscript that does not adhere to our opendata policies.

Allele Frequency of *SLC4A3* (PRA1), *TTC8* (PRA2), and *PRA-prcd* Mutations in Golden Retrievers in Brazil

Anelize Souza Trecenti¹, Giulia Gumiero Guiraldelli¹, Lukas Garrido Albertino¹, Julia Franco Ferreira¹, Fabiana Michelsen de Andrade², Alexandre Secorun Borges¹, José Paes de Oliveira-Filho^{1*}

¹ São Paulo State University (UNESP), School of Veterinary Medicine and Animal Science, Botucatu, Brazil

² Federal University of Rio Grande do Sul (UFRGS), School of Agronomy, Zootechnics Department, Porto Alegre, Brazil.

*Corresponding author: jose.oliveira-filho@unesp.br

ABSTRACT: Progressive retinal atrophy (PRA) is a term used in veterinary medicine to describe inherited and progressive retinal diseases characterized by progressive retinal degeneration and loss of vision. In the Golden Retriever (GR) breed, the mutations associated with PRA have an autosomal recessive inheritance pattern. This study aimed to verify the allele frequency of PRA1, PRA2, and PRA-prcd in the GR breed in Brazil. A total of 121 GR DNA samples (n= 66 females and n= 55 males) were analysed. All animals assessed in this study were identified as wild-type (121/121 animals; 100%) for PRA1 and PRA2 mutations; therefore, no carrier or homozygous animals were identified in this population. For the PRA-prcd mutation, 118 animals (118/121 animals; 97.52%) were wild-type. Three animals were genotyped as heterozygous for PRA-prcd (3/121 animals; 2.47%; p= 1.23%), demonstrating that this mutation is still present in some bloodlines and animals in Brazil, even with a rare prevalence. In addition, the vast majority (98.3%) of Brazilian breeders assessed in this study were unaware of these mutations as a cause of blindness in the Golden Retriever.

Keywords: Canine PRA, DNA sequence analysis, genetic disease, loss of vision, prevalence study, retinal disease

Number of words: 1298 words (excluding abstract, section files, figure and table captions, funding statement, acknowledgements, and references in the bibliography)

Number of figures: 1 figure

Number of tables: 1 table

37 INTRODUCTION

Canine diseases have been shown to be valuable natural models for the study of many varied human conditions [1-3]. Progressive retinal atrophy (PRA) is a term used in veterinary medicine to describe inherited and progressive retinal diseases characterized by progressive retinal degeneration and loss of vision [2]. Several genes have been associated with PRA forms in more than 100 dog breeds, with canine disease having higher genetic heterogeneity. While they exhibit similar clinical signs, the etiology, age of onset, and rate of progression vary among the breeds [2].

In the Golden Retriever (GR) breed, the mutations associated with PRA have an autosomal recessive character [2]. PRA1 mutation (c.2601_2602insC) is located at the *solute carrier family 4 [anion exchanger] member 3* (*SLC4A3*) gene on chromosome 37 [2]. However, the PRA2 mutation

(g.63129154delA) is located at the *tetratricopeptide repeat domain 8 (TTC8)* gene on chromosome 8 [3]. Progressive rod-cone degeneration (PRA-prcd) mutation (g.4188663G>A) [1], responsible for PRA in several breeds of dogs, including Labrador Retriever [2,7], seems to be less frequent in GR than in previous ones [2,4-6].

Once the allele frequencies can change among populations and canine Brazilian populations were never studied for these mutations, this study aimed to verify the allele frequency of PRA1, PRA2, and PRA-prcd in the GR breed in Brazil.

55 MATERIALS AND METHODS

56 Ethical approval statement

This study was approved on 09 October 2017 by the Institutional Animal Care and Use Committee (205/2017 – CEUA – UNESP), and samples were collected under a strict confidentiality agreement to ensure the anonymity of establishments, owners, and animals.

61 Sampling and genotyping procedure

A total of 121 GR DNA samples (66 females [54.5%] and 55 males [45.5%]) were used in this study. These samples were obtained from dog owners (113 samples) and a genetic database belonging to the Laboratory of Molecular Biology of the Veterinary Clinic (LBMCV) (8 samples) from São Paulo State University (UNESP), School of Veterinary Medicine and Animal Science, Botucatu, Brazil. A questionnaire was applied to characterize the animal according to pedigree information, sex, age, and clinical signs of loss of vision. The questionnaire also evaluated the knowledge of the owner about PRA mutations in the breed.

Whole blood (34 samples) and/or saliva (87 samples) samples were collected from the animals, and genomic DNA was obtained using the ReliaPrep Blood gDNA Miniprep System (Promega, Madison, WI, USA) according to the manufacturer's instructions. The samples were stored at -20°C until the PCR technique was performed.

Specific primers for amplification of the PRA1 and PRA2 mutation points were designed using online tools (Primer Express - Applied Biosystem and BLAST - Basic Local Alignment Search Tool), while the primers to amplify the PRA-prcd mutation were previously described (8) (Table 1).

PCR was performed in a total of 25 µL, which contained 12.5 µL of GoTaq Green PCR Master Mix (Promega, Madison, WI, USA), 8.5 µL of nuclease-free water, 300 µM of each primer, and 2.5 µL of DNA. In addition, a nontemplate control reaction was performed to check for the possible presence of contamination in the PCR preparations. The amplification conditions were as follows: initial denaturation at 95°C for 5 min, followed by 40 cycles of 95°C for 15 s, 60°C (PRA1 and PRA2) or 62°C (PRA-prcd) for 35 s, 72°C for 30 s, and final extension at 72°C for 1 min. Amplicons were analysed via 1.5% agarose gel electrophoresis, purified by magnetic beads technique, and subjected to Sanger direct sequencing. The obtained sequences and the electropherograms were analysed using Sequencher (Gene Code Corporation).

87 RESULTS

According to the applied questionnaire, 10.7% (13/121 animals) were less than 1 year old, 6.6% (8/121 animals) were 1 year old, 15.7% (19/121 animals) were 2 years old, 19% (23/121 animals) were 3 years old, 13.2% (16/121 animals) were 4 years old, and 34.7% (42/121 animals) were 5 years old or more.

Five animals (5/121 animals, 4.2%) had a previous eye disease, which was diagnosed by a veterinarian as entropion (2 animals), keratoconjunctivitis sicca (1 animal), corneal ulcer (1 animal), and bilateral blindness (1 animal). The majority of the owners (119/121 owners, 98.3%) did not know if any other animal from the litter had any eye disease, and only 5.8% (7/121 owners)

knew about PRA in the GR breed.

According to the obtained sequences and the electropherograms, all animals assessed in this study (121 animals) were wild-type for PRA1 and PRA2 mutations. For the PRA-prcd mutation, 118 animals (118/121 animals; 97.5%) were wild-type, and 3 animals (3/121 animals; 2.5%; $p=1.11\%$) were heterozygous (carrier) for the mutation (Figure 1).

DISCUSSION

The present study is the first report of the prevalence of PRA1, PRA2, and PRA-prcd mutations in the Brazilian GR breed. Although these mutations have not been described in Brazil, studies in other countries contributed to defining the importance of these mutations in the breed (2,3) and as valuable natural models for the study of many varied human conditions (1-3).

Reports of PRA-prcd mutations in the GR breed are rare (2,4-6). According to the Golden Retriever Club of America (4), the prevalence of this mutation in the breed was 0.06% from 1990 to 1999 and 0.05% from 2000 to 2005. After 2007, with the knowledge of the mutations that cause PRA and the introduction of commercial genetic tests, no PRA-prcd causative mutation was found in GR dogs (4). In addition, according to the Golden Retriever Club (5), this mutation is virtually eliminated from the GR population in the United Kingdom, but no data are presented.

Downs and colleagues (2) tested 80 GR dogs for PRA-prcd mutation and found a heterozygous animal (1/80 animals; 1.25%; $p=0.62\%$) among them. The frequency and number of heterozygous animals observed by the authors is lower when compared to the frequency observed in this study (1.25% versus 2.47%), but both studies demonstrate that there is a rare occurrence of the mutation in the breed in Brazil and other countries and suggesting that the test focusing on this locus is not the most informative (6).

In the same study, Downs and colleagues (2) also described another mutation named PRA1 associated with the GR breed that causes PRA. The authors tested 945 GR dogs for this mutation, and they observed a prevalence of 56.3% homozygous and 87.2% heterozygous. The allele frequency of PRA1 for GR from the United Kingdom (UK) was 4%, 6% for Sweden, 2% for France (2), and 0.5% for the United States (USA) (4). Therefore, once our sample is composed of North American blood lines, the low frequency of this mutation is expected.

The same authors described another mutation associated with the GR breed that causes PRA, named PRA2 (3). Downs and colleagues (3) tested 2,500 GR dogs, and a prevalence of 3.5% heterozygous and 96.5% wild-type animals was observed. No homozygous animals were observed in the study. The allele frequency observed in the study of PRA2 for GR from the UK was 0.01%, 0.04% for Sweden, 0.04% for Denmark, 0.03% for France, and 0.01% for the USA.

According to CBRGR (Brazilian Council for Golden Retriever Breed) (9), the Brazilian GR genetic consists of many blood lineages, especially those from the USA. Our sample was collected among breeders working with American blood lines, which could explain our results observed in this study for PRA1 and PRA2 mutations (100% wild-type; 121/121 animals), wherein no heterozygous and homozygous animals were found since the prevalence of these mutations in these bloodlines is rare (0.5% for PRA1 [4], and 0.01% for PRA2 [3]).

In conclusion, the mutations responsible for PRA1 and PRA2 were not detected in this prevalence study in the Brazilian GR population. Three animals were genotyped as heterozygous for the PRA-prcd mutation (3/121 animals; 2.47%; $p=1.23\%$), demonstrating that this mutation is still present in some bloodlines and animals in Brazil, even with a rare prevalence.

DATA AVAILABILITY STATEMENT

The original contributions presented in the study are included in the article, and further inquiries can be directed to the corresponding author.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

AST, JPOF, and FM contributed to the conception and design of the study. AST, GGG,

LGA, JFF, MLP, and FM contributed to the sample collection. AST, GGG, LGA, and JFF contributed to sample processing. AST, LGA, ASB, and JPOF contributed to writing the first drafts of the manuscript. JPOF contributed to directing the project. All authors contributed to manuscript revision and read and approved the submitted version.

FUNDING

This study was funded by the São Paulo Research Foundation (FAPESP, Brazil), Grant Number 20/15284-8.

REFERENCES

1. 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*. 88(5):551-63. 2006. doi: <https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2006.07.007>.
2. Downs, L.M., Wallin-Håkansson, B., Boursnell, M., Marklund, S., Hedhammar, Å., Truvé, K., Hübner, L., Lindblad-Toh, K., Bergström, T., Mellersh, C. S. A Frameshift Mutation in Golden Retriever Dogs with Progressive Retinal Atrophy Endorses *SLC4A3* as a Candidate Gene for Human Retinal Degenerations. *PLoS One*. 6(6):e21452. 2011. doi: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0021452>.
3. Downs, L.M., Wallin-Håkansson, B., Bergström, T., Mellersh, C. S. A novel mutation in *TTC8* is associated with progressive retinal atrophy in the golden retriever. *Canine Genet Epidemiol*. 1:4. 2014. doi: <https://doi.org/10.1186/2052-6687-1-4>.
4. Golden Retriever Club of America (GRCA). <https://grca.org/about-the-breed/health-research/> [Accessed July 21, 2021].
5. The Golden Retriever Club (GRC). <https://thegoldenretrieverclub.co.uk/> [Accessed July 21, 2021].
6. OPTIGEN. *prcd*-PRA in Golden Retrievers. http://www.optigen.com/opt9_pra_goldenrtvr.html [Accessed July 21, 2021].
7. Lewis, T.W., Mellersh, C.S. Changes in mutation frequency of eight Mendelian inherited disorders in eight pedigree dog populations following introduction of a commercial DNA test. *PLoS One*. 14(1):e0209864. 2019. doi: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0209864>.
8. Andrade, L.R., Carceres, A.M., Trecenti, A.S., Brandão, C.V.S., Gandolfi, M.G., Aguiar, E.V., Andrade, D.G.A., Borges, A.S., Oliveira-Filho, J.P. Allele Frequency of the C.5G>A Mutation in the *PRCD* Gene Responsible for Progressive Retinal Atrophy in English Cocker Spaniel Dogs. *Animals*. 9(10):884. 2019. doi: <https://doi.org/10.3390/ani9100844>.
9. Conselho Brasileiro da raça Golden Retriever (CBGR). <https://www.cbgoldenretriever.com.br/?fbclid=IwAR1unTFjoT7MrmHFk-j5nY-i0a4FG3VMgvyuqD4tn8za6P2X65V8bWd9HTw> [Accessed July 21, 2021].

Table 1. PCR and sequencing primer sets used in this study

Primer sets	Primer sequences (5' – 3')	Product (bp ¹)	Melting
PRA1	GTAGTTGGATGTCGTGGAATACT CCGGCCTGATTAAACCTCTT	473	60 °C
PRA2	CTCTGGTCTGGAACCGATTATTT GGATCTGAAGGTGCAGATT	493	60 °C
PRA-prcd ²	CCAGTGGCAGCAGGAACC CCGACCTGCTGCCCCACGACTG	512	62 °C

¹Base pairs, ²Primers previously describe (8).

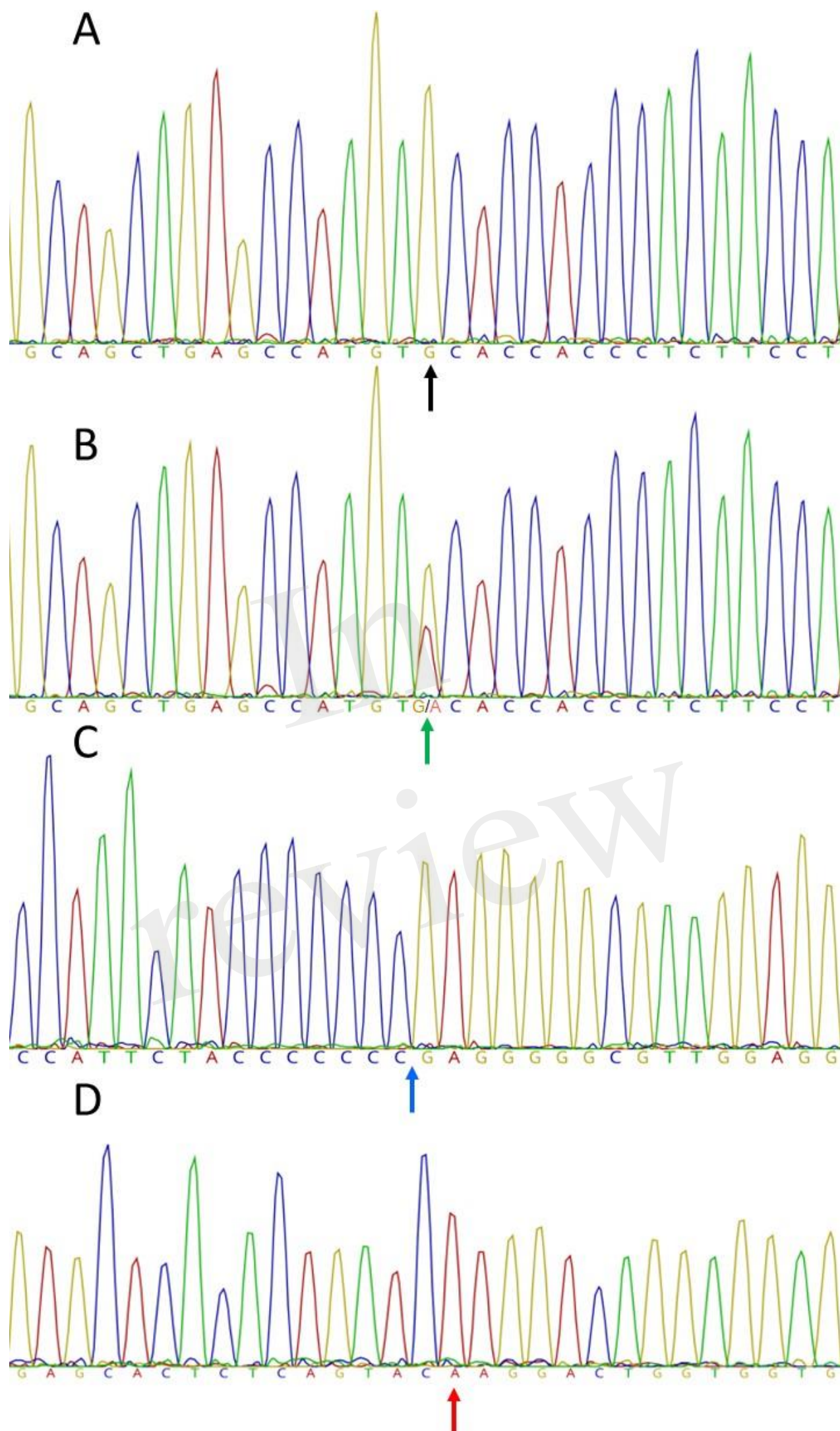
In
review

Figure captions

190

191 Figure 1. Partial chromatogram showing capillary sequencing results for homozygous wildtype (A)
192 and heterozygous (B) mutant alleles of the (g.4188663G>A, PRA-prcd) mutation in the *PRCD*
193 gene, homozygous wildtype (C) allele of the (c.2601_2602insC; PRA1) mutation in the *SLC4A3*
194 gene, and homozygous wildtype (D) allele of the (g.63129154delA; PRA2) mutation in the *TTC8*
195 gene in Golden Retrievers dogs. A, wildtype allele (guanine) (black arrow); B, double peak
196 (guanine / adenine) (green arrow); C, 8th cytosine insertion point (blue arrow); D, point of an
197 adenine deletion (red arrow). Image obtained using Geneious® 10.0 software (Biomatters Ltd.,
198 Auckland, New Zealand).

In
review



CAPÍTULO III

ANEXOS 1

Termo de consentimento e questionário para tutores e médicos veterinários
durante a colheita das amostras

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Declaro para os devidos fins que estou ciente e autorizo a realização do Projeto de Pesquisa intitulado ESTUDO DA PREVALÊNCIA DAS MUTAÇÕES PRA_1, PRA_2 E PRCD RESPONSÁVEIS PELA ATROFIA PROGRESSIVA DE RETINA EM CÃES DA RAÇA GOLDEN RETRIEVER, de Me. Anelize de Souza Trecenti Santana sob a responsabilidade do Prof. Dr. José Paes de Oliveira Filho.

(Contribuição dos graduandos Júlia Franco-UNESP-BOTUCATU, Lukas Garrido Albertino- UNESP-BOTUCATU, Monalisa Peres -FAEF-GARÇA.

Descrição detalhada dos procedimentos, em linguagem não científica:

- Coleta de amostra por swab oral ou sangue em tubo com EDTA.
- Extração de DNA a partir da amostra coletada
- Realização de teste genético para Atrofia Progressiva de Retina.

Nome dos Animais

1.

2.

3.

NOME DO RESPONSÁVEL:

RG:

Data:

Assinatura: _____

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
Seção Técnica Acadêmica
Rua Prof. Dr. Walter Mauricio Corrêa, s/n
UNESP – Campus de Botucatu – CEP: 18618-681
(14)38802176 – www.fmvz.unesp.br

Número da ficha: _____ raça: _____

Nome do animal: _____ sexo: _____ idade: _____

Nome do Proprietário: _____

Data da coleta da amostra de sangue: _____

Questionário

1) O animal apresenta ou apresentava resistência em entrar em ambientes claros ou escuros? Dificuldade em movimentar em ambientes com contraste (piso preto e branco) ou penumbra? Dificuldade para subir ou descer de móveis como sofá ou cama e /ou escada? Há quanto tempo?

2) O animal apresenta ou apresentava dificuldade de enxergar objetos em movimento ou estático (próximo ou distante)? Há quanto tempo?

3) Observou catarata? Há quanto tempo?

4) Observou midríase? Há quanto tempo?

Esquema de exame oftalmológico

Reflexo de ameaça OD	Presente	Ausente
Reflexo de ameaça OE		

Teste da bola de algodão OD	Presente		Ausente	
	D	N	D	N
Teste da bola de algodão OE	D	N	D	N

Reflexo pupilar direto OD	Presente	Ausente	Diminuído
Reflexo pupilar Consensual OE			
Reflexo pupilar direto OE			
Reflexo pupilar Consensual OD			

Dazzle OD	Presente	Ausente	Diminuído
Dazzle OE			

Cristalino	Catarata	Ausência de catarata
Olho direito		
Olho esquerdo		

Fundoscopia	Observações	Olho direito	Olho esquerdo
Área tapetal			
Área não tapetal			
Vasos retinianos			
Nervo óptico			
Reflexo de fundo			

ANEXO 2

Questionário online enviado aos tutores após coleta



Projeto De Pesquisa PRA (Atrofia Progressiva De Retina) Em Cães da Raça Golden Retriever

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Declaro para os devidos fins que estou ciente e autorizo a realização do Projeto de Pesquisa intitulado ESTUDO DA PREVALÊNCIA DAS MUTAÇÕES PRA_1, PRA_2 E PRCD RESPONSÁVEIS PELA ATROFIA PROGRESSIVA DE RETINA EM CÃES DA RAÇA GOLDEN RETRIEVER, de Me. Anelize de Souza Trecenti Santana sob a responsabilidade do Prof. Dr. José Paes de Oliveira Filho.

(Contribuição dos graduandos Júlia Franco-UNESP-BOTUCATU, Lukas Garrido Albertino-UNESP-BOTUCATU, Monalisa Peres -FAEF-GARÇA.

Descrição detalhada dos procedimentos, em linguagem não científica:

- Coleta de amostra por swab oral ou sangue em tubo com EDTA.
- Extração de DNA a partir da amostra coletada
- Realização de teste genético para Atrofia Progressiva de Retina.

Nome do Tutor

Sua resposta

Contato do tutor

Sua resposta

Nome do animal

Sua resposta

Sexo do animal

☐ Macho

☐ Fêmea

Idade do animal

☐ Menos de 1 ano

☐ 1 ano

☐ 2 anos

☐ 3 anos

☐ 4 anos

☐ Mais de 5 anos

O animal já apresentou alguma enfermidade nos olhos?

☐ Sim

☐ Não

Alguém do grupo familiar do animal já foi diagnosticado com alguma enfermidade nos olhos?

☐ Sim

☐ Não

Se SIM, qual foi a enfermidade diagnosticada?

Sua resposta _____

Você já ouviu falar sobre a Atrofia Progressiva de Retina em cães?

☐ Sim

☐ Não