

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP**

**CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**METALOPROTEINASES DE MATRIZ 2 E 9 NO LÍQUIDO  
CEFALORRAQUIDIANO E SORO DE CÃES  
NATURALMENTE INFECTADOS PELO VÍRUS DA  
CINOMOSE.**

**Caroline Godoi Aoki**

Médica Veterinária

**2014**

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP**

**CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**METALOPROTEINASES DE MATRIZ 2 E 9 NO LÍQUIDO  
CEFALORRAQUIDIANO E SORO DE CÃES  
NATURALMENTE INFECTADOS PELO VÍRUS DA  
CINOMOSE.**

**Caroline Godoi Aoki**

**Orientadora: Profa. Dra. Márcia Ferreira da Rosa Sobreira**

**Coorientadora: Profa. Dra. Gisele Fabrino Machado**

Dissertação apresentado à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Medicina Veterinária.

**2014**

## **DADOS CURRICULARES DA AUTORA**

**Caroline Godoi Aoki** – nascida em 17 de julho de 1986, na cidade de Araçatuba-SP, ingressou no curso de graduação de Medicina Veterinária na Faculdade de Odontologia de Araçatuba da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (atual Faculdade de Medicina Veterinária – FMVA) em março de 2005 com conclusão em dezembro de 2009, onde realizou iniciação científica com pesquisa relacionada a Leishmaniose em felinos. Em fevereiro de 2010 iniciou pós-graduação “Lato Sensu” no Programa de Aprimoramento Profissional em Clínica Médica de Pequenos Animais na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias/UNESP câmpus de Jaboticabal, concluindo-o em janeiro de 2012. Em março de 2012 ingressou no curso de Mestrado na área de Medicina Veterinária com ênfase em Clínica Médica desta mesma Faculdade. Em julho de 2012 deu início a pós-graduação “Lato Sensu” em Acupuntura Veterinária pelo Instituto Bioethicus, Botucatu-SP com término previsto para julho de 2014.

## DEDICATÓRIA

Dedico aos meus pais por sempre me apoiarem e  
acreditarem em minhas escolhas.  
À minha sobrinha por proporcionar carinho e alegria.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a minha orientadora Profa. Márcia, pela orientação e amizade.

Ao Prof. Aureo, por disponibilizar os recursos do Laboratório de Patologia Clínica do Hospital Veterinário e assim contribuir para novos aprendizados na área.

À FAPESP pela bolsa concedida e financiamento à pesquisa, o que possibilitou o desenvolvimento desse projeto.

Ao meu noivo Jonathan, por tornar meus dias mais tranquilos.

Aos residentes da clínica médica, em especial a Ana Paula e Felipe.

Aos pós-graduandos Reinaldo, Camila e Tiago pelo auxílio na pesquisa.

À equipe do Laboratório de Patologia Clínica, Nathan, Matheus, Douglas, pós-graduandos e estagiários que contribuíram para a realização dos exames.

À minha coorientadora, Gisele por disponibilizar o Laboratório de Patologia Aplicada da FMVA/UNESP para o desenvolvimento da zimografia.

Ao pós-graduando Guilherme (FMVA), por transferir o aprendizado da técnica de zimografia e pela dedicação.

A todos os residentes, pós-graduandos e funcionários da FCAV que de alguma forma ajudaram na conclusão deste trabalho.

Aos amigos Bya, Fernanda, Mariana, Nathan, Reinaldo e todos outros não citados pelo convívio e apoio.

Ao Professor Antonio Sergio Ferraud e à Pós-Doutoranda Marcela Aldrovani por realizarem a estatística desse trabalho.

À equipe do Laboratório de Diagnóstico Molecular do Departamento de Microbiologia-imunologia do Instituto de Biociências da UNESP câmpus de Botucatu pela colaboração científica.

À equipe do Laboratório do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva da FCAV/UNESP câmpus de Jaboticabal, por ceder as sorologias.

Aos proprietários que gentilmente cederam seus cães para o desenvolvimento do projeto.

A banca de qualificação, Prof. Marlos e Prof. Ferraud e à banca de defesa, Prof. Aureo e Profa. Maria Angélica pela contribuição no trabalho.

## SUMÁRIO

	Página
RESUMO.....	ii
Palavras chaves.....	ii
ABSTRACT.....	iii
Keywords.....	iii
LISTA DE ABREVIATURAS.....	iv
LISTA DE TABELAS.....	v
LISTA DE FIGURAS.....	vi
LISTA DE QUADROS.....	vii
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	2
2.1 Cinomose canina.....	2
2.2 Metaloproteinase de matriz.....	5
3 OBJETIVOS.....	8
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	9
4.1 Grupos experimentais.....	9
4.1.1 Seleção das parcelas experimentais para o grupo Gcon (controle).....	10
4.1.2 Seleção das parcelas experimentais para o grupo Gcin (cinomose).....	10
4.2 Análise físico-química do liquor.....	11
4.3 Quantificação das metaloproteinases de matriz.....	12
4.4 Análise dos resultados.....	13
5 RESULTADOS.....	15
5.1 Metaloproteinase de matriz.....	16
5.2 Análise estatística multivariada exploratória.....	19
5.3 Análise estatística univariada.....	23
6 DISCUSSÃO.....	25
7 CONCLUSÕES.....	31
8 REFERÊNCIAS.....	32
APÊNDICES.....	40

## **METALOPROTEINASES DE MATRIZ 2 E 9 NO LÍQUIDO CEFALORRAQUIDIANO E SORO DE CÃES NATURALMENTE INFECTADOS PELO VÍRUS DA CINOMOSE.**

**RESUMO** - A cinomose canina é uma importante afecção contagiosa, com elevada taxa de letalidade e comprometimento multissistêmico, incluindo o sistema nervoso central. A leucoencefalite desmielinizante é a principal alteração neuropatológica observada, sendo sua patogênese pouco conhecida. A quebra da barreira hematoencefálica (BHE) com penetração viral e infiltração leucocitária são aspectos cruciais no desenvolvimento da encefalite desmielinizante. Em seres humanos e animais com alterações semelhantes, as metaloproteinases da matriz (MMPs), principalmente 2 e 9, vem sendo apontadas como os agentes desestruturantes da integridade da BHE. Assim, buscou-se estabelecer o envolvimento das MMPs 2 e 9 na quebra da BHE de cães com cinomose em fase neurológica. O presente estudo teve como escopo principal determinar e quantificar tais enzimas, pela técnica de zimografia, no soro e no liquor de cães hígidos (Gcon, n=10) e cães com cinomose na fase neurológica (Gcin, n=10). Além disso, foram determinados os parâmetros físico-químicos do liquor para a obtenção de maiores informações acerca da integridade da BHE. A análise estatística multivariada exploratória mostrou padrões distintos segundo as variáveis estudadas, sendo estas comparadas entre os grupos com o teste *t*.

**Palavras-chave:** encefalite viral, liquor, barreira hematoencefálica.

## **MATRIX METALLOPROTEINASES 2 AND 9 IN CEREBROSPINAL FLUID AND SERUM OF DOGS NATURALLY INFECTED WITH CANINE DISTEMPER.**

**ABSTRACT** – Canine distemper is an important contagious disease with high mortality rate and multisystem involvement including the central nervous system. The demyelinating leukoencephalitis is the main neuropathological alteration observed and its pathogenesis is not well known. The rupture of the blood brain barrier (BBB) with viral penetration and leukocyte infiltration are crucial for the development of demyelinating encephalitis. In humans and animals with similar disorders, matrix metalloproteinases (MMPs) especially 2 and 9 have been pointed as the agents that destabilize the integrity of the BBB. Thus, we sought to establish the involvement of MMPs 2 and 9 in BBB rupture of dogs with distemper at the neurological phase. The present study aimed to determine and quantify these enzymes by the technique of zymography in serum and cerebrospinal fluid of healthy dogs (Gcon, n=10) and dogs with distemper at neurological stage (Gcin, n=10). Furthermore, we determined the physicochemical parameters of liquor to obtain more information about the integrity of the BBB. Exploratory multivariate analysis showed distinct patterns according to the variants studied, which were compared between groups with t test.

**Keywords:** viral encephalitis, liquor, blood-brain barrier.

## LISTA DE ABREVIATURAS

°C – Graus Celsius  
μL – Microlitro  
BHE – Barreira hematoencefálica  
dL – Decilitro  
kDa – Quilodalton  
kg – Quilograma  
LCR – Líquido cefalorraquidiano  
mA – Miliampere  
MEC - Matriz extracelular  
mg – Miligrama  
mL – Mililitros  
MMP – Metaloproteinase de matriz  
PCR – Reação em cadeia da polimerase  
pH – Potencial hidrogeniônico  
próMMP – Metaloproteinase de matriz inativa  
PT – Proteína total  
QA – Cota de albumina  
RIFI – Reação de imunofluorescência indireta  
RT-PCR – Reação em cadeia da polimerase em tempo real  
SAM – Soroaglutinação microscópica  
SDS - Dodecil sulfato de sódio  
SNC – Sistema nervoso central  
SRD – Sem raça definida  
TEMED - N, N, N',N'-tetrametiletilenodiamina  
TIMP – Inibidores teciduais das metaloproteinases de matriz  
V – Volts

**LISTA DE TABELAS**

	Página
Tabela 1	15
Valores individuais, médias e respectivos erros padrões para a celularidade, proteínas totais e glicose líquóricas bem como para a glicose sanguínea de cães do grupo controle (Gcon) e grupo cinomose (Gcin). Jaboticabal, 2014.	
Tabela 2	16
Valores individuais, médias e respectivos erros padrões para a albumina sérica e líquórica, e cota de albumina (QA), em cães do grupo controle (Gcon) e grupo cinomose (Gcin). Jaboticabal, 2014.	
Tabela 3	18
Valores individuais, médias e respectivos erros padrões das próMMP-2 e MMP-2 em liquor e soro de cães do grupo controle (Gcon) e grupo cinomose (Gcin). Jaboticabal, 2014.	
Tabela 4	18
Valores individuais, médias e respectivos erros padrões das próMMP-9 e MMP-9 em liquor e soro de cães do grupo controle (Gcon) e grupo cinomose (Gcin). Jaboticabal, 2014.	
Tabela 5	24
Comparação entre os grupos controle (Gcon) e cinomose (Gcin) com relação às diferentes variáveis avaliadas com suas respectivas médias $\pm$ erro padrão da média, valores de p e índice de confiança (IC). Jaboticabal, 2014.	

## LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1	17
<p>Zimografia de líquido cefalorraquidiano (LCR) e soro em gel de poliacrilamida 10%. Padrão de peso molecular (PM) em animais do grupo controle (1 e 2) e cinomose (3 – 9). Atividade gelatinolítica das próMMP-9 (92kDa); MMP-9 (86kDa); próMMP-2 (72kDa); MMP-2 (66kDa).</p>	
Figura 2	19
<p>Distribuição das próMMP-2, MMP-2, próMMP-9 e MMP-9 de amostras de líquor e soro de cães dos grupos controle e com cinomose. A linha horizontal representam as medianas em relação á intensidade das unidades inversas de densidade óptica (unidades arbitrárias – U.A.) a partir das bandas gelatinolíticas. *Indica os valores de <math>p &lt; 0,05</math>.</p>	
Figura 3	20
<p>Dendrograma demonstrando separação dos grupos controle (Gcon) e cinomose (Gcin), sendo A= animais do grupo Gcin e C= animais do grupo Gcon.</p>	
Figura 4	21
<p>Centróides dos grupos controle (Gcon) e cinomose (Gcin) por análise de agrupamento por método não hierárquico.</p>	
Figura 5	22
<p>Gráfico biplot formado pelos maiores autovetores CP1 e CP2, demonstrando a relação entre as variáveis próMMP-2 no soro (próMMP-2S), próMMP-9 no soro (próMMP-9S), glicemia, glicorraquia, próMMP-2 no líquor (próMMP-2L), contagem células nucleadas no líquor (cont_Cel), proteína total no líquor (PT), cota de albumina (QA), albumina no líquor (Albu_LCR) e albumina sérica (Albu_sér) em cada animal (grupo controle = C1-C10; grupo cinomose A1-A10).</p>	

**LISTA DE QUADROS**

	Página
Quadro 1 Poder discriminatório das variáveis – correlação entre cada variável e um componente principal. Demonstra a medida do gráfico Biplot. Os destaques em negrito mostram as variáveis com poder discriminatório.	23

## 1. INTRODUÇÃO

Disfunções envolvendo o sistema nervoso central (SNC) de cães são comumente observadas na rotina clínica, abrangendo causas inflamatórias, tóxicas, nutricionais, metabólicas, neoplásicas e infecciosas. Apesar da prática de imunização preventiva, afecções como a cinomose ainda detêm importância econômica, por tratar-se de uma doença neurológica que afeta a população canina em todo o mundo (HEADLEY; GRAÇA, 2000; AMUDE et al., 2012). Os animais acometidos podem desenvolver sinais clínicos não patognômicos relacionados a distúrbios respiratórios, gastrointestinais, dermatológicos, oftálmicos ou neurológicos, o que dificulta o diagnóstico (GREENE; APPEL, 2006).

Em casos onde haja acometimento do SNC, acredita-se que a via primordial da entrada do vírus neste sistema seja a hematogênica, em especial através de leucócitos contendo partículas virais que ultrapassam a barreira hematoencefálica (BHE). É provável que a quebra da BHE por enzimas proteolíticas, denominadas metaloproteinases de matriz (MMPs), seja responsável pelo influxo de células inflamatórias e progressão da lesão desmielinizante (MIAO et al., 2003; BEINEKE et al., 2009).

Em cães, pouco se conhece sobre a participação das referidas MMPs na patogênese de enfermidades que acometem o SNC, sabe-se de seu envolvimento em afecções neurológicas como neoplasias cerebrais (LUKASZEWICZ-ZAJAC et al., 2013) e hérnia de disco (LEVINE et al., 2006). Alguns ensaios em cães portadores de leishmaniose visceral demonstraram atividades aumentadas dessas enzimas em amostras de líquor, soro e tecido nervoso (MARANGONI et al., 2011; MELO et al., 2011).

Vários estudos evidenciaram a participação das MMP-2 e -9 em processos que acometem o SNC de pacientes humanos como um dos principais fatores envolvidos na quebra da BHE, o que favorece a progressão e agravamento da lesão (ROSENBERG, 1995; YONG et al., 2001). Diante do exposto, buscou-se estudar as MMP-2 e -9 em amostras de líquor e soro de cães naturalmente infectados pelo vírus da cinomose na fase neurológica.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Cinomose canina

A cinomose é uma doença viral multissistêmica altamente contagiosa, de distribuição mundial e com elevada taxa de letalidade em cães e diversos carnívoros selvagens. Pertencente à família *Paramyxoviridae* e ao gênero *Morbillivirus*, esse vírus envelopado possui ácido ribonucléico de fita simples e frequentemente afeta o sistema nervoso central de seu hospedeiro (HEADLEY; GRAÇA, 2000; GRIOT et al., 2003; GREENE; APPEL, 2006).

No Brasil, estudos epidemiológicos são escassos, mas sugerem que o vírus da cinomose é endêmico em populações caninas urbanas, com resultado positivo na técnica de RT-PCR variando de 47,1% a 66,5% em cães com sintomatologia compatível com a doença (GEBARA et al., 2004; NEGRÃO et al., 2007). Budaszewski et al. (2013) descreveram 40,2% de positividade pela mesma técnica em amostras provenientes de sete estados brasileiros, sendo estes o Rio Grande do Sul, Santa Catarina, Paraná, São Paulo, Rio de Janeiro, Rondônia e Mato Grosso. Deste percentual de cães positivos, 58% apresentavam algum sintoma sugestivo de cinomose e 23,8% eram assintomáticos. Este achado mostra-se coerente com a estimativa de que uma porcentagem dos cães susceptíveis ao vírus estão infectados na forma sub-clínica e podem transmiti-lo mesmo sem apresentar nenhum sinal clínico (GREENE; APPEL, 2006).

A transmissão ocorre via aerossol, seguida de replicação viral no tecido linfóide do trato respiratório. Em princípio, o vírus se dissemina pelo sangue e linfa para os tecidos hematopoiéticos distantes, como baço, timo, medula óssea, linfonodos, macrófagos da lâmina própria entérica e células de Kupffer no fígado. Após alguns dias resulta na infecção do parênquima de vários órgãos e células de todo o corpo (OKITA et al., 1997; BEINEKE et al., 2009). A cinomose é caracterizada por severa leucopenia e perda da capacidade de proliferação dos linfócitos, que desencadeia imunossupressão e aumento da susceptibilidade à

infecções secundárias, uma das principais causas de óbito associada ao vírus (BEINEKE et al., 2009).

A entrada do vírus no SNC leva a uma séria complicação com consequentes alterações neurológicas e prognóstico reservado. Usualmente, os sinais neurológicos ocorrem na ausência de alterações sistêmicas sendo que as manifestações neurológicas são diversas e progressivas, podendo incluir mioclonia, nistagmo, ataxia, tetraparesia, tetraplegia e convulsões (AMUDE et al., 2007; AMUDE et al., 2012). Os animais que evoluem para essa condição clínico-patológica usualmente progridem a óbito e aqueles poucos que se recuperam, em grande parte apresentam sequelas neurológicas (BEINEKE et al., 2009).

O grau de comprometimento do SNC é dependente da estirpe viral, da idade e da imunocompetência do paciente acometido, sendo a leucoencefalite desmielinizante o principal achado neuropatológico (VANDEVELDE; ZURBRIGGEN, 2005; GREENE; APPEL, 2006).

Os mecanismos pelos quais as partículas virais penetram no SNC ainda não estão totalmente elucidados. Lesões periventriculares e abaixo da pia-mater, associadas ao fato do vírus ser facilmente encontrado nas células endoteliais e plexo coróide sugerem que a penetração viral no tecido cerebral ocorra através do LCR por intermédio de leucócitos infectados (HIGGINS et al., 1982; VANDEVELDE; ZURBRIGGEN, 1995; CARVALHO et al., 2012).

As alterações da encefalite, na cinomose canina, podem ser verificadas em duas grandes fases: aguda e crônica. Inicialmente as lesões desmielinizantes na fase aguda estão associadas à ação direta do vírus em células nervosas como os oligodendrócitos (VANDEVELDE; ZURBRIGGEN, 2005). Já na fase crônica, observam-se maciças infiltrações de células inflamatórias mononucleares, principalmente CD8+, CD4+ e células B, sugerindo um componente imunomediado envolvido na progressão e agravamento da lesão (WÜNSCHMANN et al., 1999).

Na substância cinzenta, o vírus infecta neurônios, o que pode ocasionar necrose neuronal ou, até mesmo, polioencefalomalácia. Já, na substância branca, a lesão se caracteriza pela perda seletiva da bainha de mielina (VANDEVELDE; ZURBRIGGEN, 1995; CARVALHO et al., 2012). Assim, devido às similaridades morfológicas das alterações neuropatológicas da leucoencefalite desmielinizante em seres humanos tais como a esclerose múltipla, a cinomose canina representa

uma das poucas ocorrências espontâneas em modelos animais para o estudo da patogênese da perda de mielina associada às doenças imunomediadas (BEINEKE et al., 2009; WYSS-FLUEHMANN et al., 2010).

Na rotina da clínica médica, uma importante forma de avaliação do SNC é alcançada por intermédio do estudo das características físico-químicas e citológicas do líquor. Desta forma, a análise do LCR é um auxílio diagnóstico importante nas enfermidades neurológicas caninas, visto que sua composição varia em diferentes situações. Contudo, dificilmente fornece um diagnóstico específico (ANDREWS, 1998).

A concentração de glicose no líquor varia diretamente com a plasmática, representando de 60 a 80% da taxa glicêmica em cães normais e, de acordo com Gama et al. (2005), cães com cinomose na fase neurológica mantiveram os valores da glicorraquia dentro da faixa de normalidade para a espécie.

Ainda referente aos resultados encontrados por Gama et al. (2005), os referidos autores observaram aumento na contagem total de células nucleadas no líquor de cães nessa condição, assim como aumento significativo do componente proteico. Associada a tais características, a cota de albumina (relação entre albumina líquórica e albumina sérica), pode ser utilizada para estimar a integridade da BHE. Tal cota revela-se estável em animais hígidos e por isso pode ser útil na avaliação das desordens do SNC (TERLIZZI; PLATT, 2009).

A BHE é uma interface biológica única, que mantém a homeostase cerebral por prevenir e regular a permeabilidade a substâncias e microorganismos para dentro do tecido nervoso (CARDOSO et al., 2010).

O componente mais importante da BHE é a célula endotelial microvascular cerebral. Proteínas especializadas como a claudina, ocludina e caderinas mantêm essas células para formarem junções oclusivas, áreas onde as células endoteliais adjacentes estão fisicamente unidas, tornando o transporte transcelular passivo de pequenas moléculas hidrofílicas extremamente difícil. A superfície dessas células também é anionicamente forte, por criar uma barreira eletrostática para o transporte de compostos de carga negativa. Além das barreiras física e elétrica, estas células também possuem um bloqueio metabólico como enzimas intra e extracelulares, as quais convertem substratos em compostos menos permeáveis ou menos tóxicos. Adicionalmente, a BHE é uma barreira imunológica que previne

a entrada de vírus e bactérias para o SNC (ABBOTT et al., 2010; CARDOSO et al., 2010; SLOAN et al., 2012).

Se a integridade da BHE estiver comprometida, substâncias indesejáveis podem adentrar o SNC e gerar uma resposta imune ou inflamatória. Assim, o aumento da permeabilidade é caracterizado por perda das junções celulares e degradação da membrana basal. Diversos são os mecanismos e componentes envolvidos nesse processo e dentre eles, têm sido evidenciada a participação de um grupo de enzimas denominadas metaloproteinases de matriz (MMP) como sugerido por Miao et al. (2003) e Wang et al. (2008).

## **2.2 Metaloproteinases de matriz**

As MMPs são enzimas que, dentre outras atividades, estão envolvidas em doenças do SNC de seres humanos e animais, sendo expressas em níveis baixos a indetectáveis em adultos normais e de forma aumentada no LCR e tecido nervoso em diversas alterações neurológicas, incluindo meningites virais, bacterianas, esclerose múltipla, neoplasias e isquemia cerebral (ROSENBERG, 1995; COSSINS et al., 1997; KOLB et al., 1998; LEPPERT et al., 2000; LUKASZEWICZ-ZAJAC, 2013). Também estão envolvidas nos processos fisiológicos (MCCAWLEY; MATRISIAN, 2001), assim como em outros processos patológicos como artrite, doenças cardíacas degenerativas e neoplasias (SEMOLIN, 2013).

Tais enzimas constituem uma família de endopeptidases zinco-cálcio dependentes, tradicionalmente reconhecidas como responsáveis pela remodelação e manutenção da integridade da matriz extracelular (MEC). São secretadas na forma latente como proenzimas (próMMP) e necessitam de clivagem a partir de proteases para serem ativadas (YONG et al., 2001). A MEC é composta, dentre outras substâncias, de proteoglicanos, glicoproteínas e um sistema fibrilar altamente organizado que mantém sua integridade estrutural, além de realizar o transporte de íons, migração celular e produção de fatores de crescimento. Esta integridade é mantida pelo equilíbrio entre a síntese e degradação de seus

componentes que, por sua vez, é mediada, em parte, pelas MMPs e seus inibidores teciduais (TIMPs) (LUKES et al., 1999).

A quebra da homeostase no referido sistema pode desencadear desordens neurológicas graves, em consequência da acentuada expressão de MMP, principalmente 2 e 9, tal qual verificada na doença de Alzheimer (BACKSTROM et al., 1996), esclerose múltipla (LEPPERT et al., 1998) e esclerose lateral amiotrófica (LIM et al., 1996).

A MMP-2 (Gelatinase A) e MMP-9 (Gelatinase B) degradam a elastina, a fibronectina e o colágeno tipo IV, V e VII presentes na MEC de vários tecidos incluindo a membrana basal da BHE. Sistemicamente, as células fonte dessas enzimas são os macrófagos, neutrófilos e linfócitos, enquanto no SNC são astrócitos, micróglia, oligodendrócitos e neurônios (LUKES, 1999; ROSENBERG, 2002).

Como referido, a invasão viral do SNC é um ponto importante na patogênese da cinomose e diversos estudos apontam para o envolvimento das MMP-2 e -9 na quebra da BHE, com consequente passagem de leucócitos do sangue periférico para o SNC. Dessa forma, tal quebra poderia contribuir com a progressão da inflamação e agravamento da lesão do SNC, assim como com a desmielinização neuronal em doenças desmielinizantes (CHANDLER et al., 1995; KOLB et al., 1998; CUZNER; OPDENAKKER, 1999; HARTUNG; KIESEIER, 2000; ROSENBERG, 2002; SULIK et al., 2008; SCHWARTZ et al., 2010; CANDELARIO-JALIL et al., 2011; ROSENBERG, 2012).

Chandler et al. (1995) e Leppert et al. (1995) sugerem que a migração de leucócitos ocorra devido a lesão da membrana basal que circunda os vasos do SNC, enquanto a desmielinização advém da degradação da proteína básica da mielina, a principal proteína extrínseca de membrana da mielina no SNC, ambas por ação das MMPs.

A forma latente da MMP-2 (próMMP-2) está normalmente presente no LCR de seres humanos e animais saudáveis, enquanto que a MMP-9 (forma ativa) está presente apenas em processos patológicos, embora a MMP-2 também possa estar presente em sua forma ativa em tais processos (ROSENBERG, 1995; MUN-BRYCE; ROSENBERG, 1998).

Em seres humanos que apresentam demência pelo vírus da imunodeficiência, as MMP-2 e -9 encontram-se elevadas em amostras de liquor quando comparadas com outros portadores sem alterações neurológicas (CONANT et al., 1999). Observa-se que a MMP-9 também está aumentada em pacientes com neuroborreliose de Lyme, assim como nas meningites bacteriana e viral (KOLB et al., 1998; PERIDES et al., 1998; LEPPERT et al., 2000).

Estudos de tecido cerebral, plasma e LCR de pacientes com esclerose múltipla têm mostrado relação direta entre a fase da doença e a quantidade de MMPs, particularmente a MMP-9 (COSSINS et al., 1997; LEPPERT et al., 1998; FAINARDI et al., 2006).

Pesquisas em animais têm evidenciado elevação dessas endopeptidases no SNC em condições como neoplasias cerebrais (TURBA et al., 2007), cinomose (MIAO et al., 2003), hérnia de disco (LEVINE et al., 2006) e leishmaniose visceral canina (MARANGONI et al., 2011; MELO et al., 2011).

Segundo Miao et al. (2003), houve elevada expressão de MMPs em tecido nervoso de cães naturalmente infectados pelo vírus da cinomose na fase neurológica. Os mesmos autores observaram diferenças nas expressões das MMPs de acordo com a fase da lesão desmielinizante (aguda ou crônica).

Wang et al. (2008), em modelos experimentais com flavivirus neurotrópicos, descreveram que a MMP-9 facilitou a penetração viral no SNC por aumentar a permeabilidade da BHE. Tal conclusão coincidiu com a evidência de que a MMP-9 tem sua expressão aumentada no sangue e no tecido nervoso de camundongos infectados. Além disso, os camundongos MMP9<sup>-/-</sup>, ou seja, que não expressam a MMP-9, infectados experimentalmente, demonstraram redução da infiltração leucocitária e da lesão no tecido nervoso.

Dessa forma, a emergente e crescente quantidade e qualidade dos dados sinalizam que as MMP-2 e -9 possam estar envolvidas nos processos lesivos tanto à BHE quanto ao SNC na fase neurológica da cinomose. Devido a tais propriedades das MMPs, são crescentes as pesquisas direcionadas à utilização de drogas que inibam a ação dessas enzimas como, por exemplo, seus TIMPs, como oportunidade terapêutica.

### 3. OBJETIVOS

Neste ensaio objetivou-se:

a) Quantificar as concentrações das metaloproteinases de matriz 2 e 9, pela técnica da zimografia, no líquido cefalorraquidiano e soro de cães naturalmente infectados pelo vírus da cinomose na fase neurológica e em cães saudáveis;

b) Quantificar o número de células nucleadas, as concentrações de glicose, proteínas totais, albumina e cota de albumina no líquor de cães naturalmente infectados pelo vírus da cinomose, na fase neurológica, bem como em cães saudáveis;

c) Caracterizar, pela análise estatística multivariada exploratória, os animais com cinomose na fase neurológica com base nas metaloproteinases de matriz 2 e 9 do líquor e soro, glicorraquia, celularidade, proteínas totais, albumina e cota de albumina líquóricas, além de albumina sérica e glicemia.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

Este estudo foi aprovado pela Comissão de Ética e Bem-estar Animal da FCAV-UNESP (protocolo nº006353/12) em 21 de maio de 2012.

### 4.1 Grupos experimentais

Para realização do protocolo experimental, foram instituídos dois grupos de estudo, um controle, denominado Gcon, constituído por 10 cães hígdidos, adultos, independente de raça e sexo, provenientes do canil do Hospital Veterinário “Governador Laudo Natel” – FCAV/UNESP, Câmpus de Jaboticabal e outro de cães com cinomose, em fase neurológica, denominado Gcin, igualmente constituído por 10 cães, independente da idade, raça e sexo, portadores do vírus da cinomose canina com manifestação neurológica, também selecionados junto à rotina do Serviço Ambulatorial da Clínica Médica de Pequenos Animais do Hospital Veterinário “Governador Laudo Natel” – FCAV/UNESP, Câmpus de Jaboticabal.

Em todos os animais de ambos os grupos foram realizados testes laboratoriais para a exclusão de outras doenças infecciosas como erliquiose, babesiose, toxoplasmose, neosporose e leptospirose.

Foi realizada reação em cadeia da polimerase (PCR) em amostra de sangue total para pesquisa de *Ehrlichia canis* (Real Time PCR) e *Babesia canis* (Semi Nested PCR) no Laboratório de Diagnóstico Molecular (serviço terceirizado) localizado no Departamento de Microbiologia-imunologia do Instituto de Bociências da UNESP Câmpus de Botucatu. Para pesquisa de *Toxoplasma gondii* e *Neospora caninum* realizou-se a reação de imunofluorescência indireta a partir de uma alíquota de soro sanguíneo enviada ao Laboratório Imunodot (serviço terceirizado) localizado na Cidade de Jaboticabal-SP. Outra alíquota de soro foi encaminhada ao Laboratório do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva da FCAV/UNESP, Câmpus de Jaboticabal, onde foi realizada a titulação de anticorpos anti-*Leptospira* sp, processadas pela técnica de reação de soroaglutinação microscópica.

No caso da cinomose, foi realizada a pesquisa do vírus por Real Time PCR em amostra de urina e swab de conjuntiva no mesmo Laboratório de Diagnóstico Molecular do Departamento de Microbiologia-imunologia do Instituto de Biociências da UNESP Câmpus de Botucatu.

#### **4.1.1 Seleção das parcelas experimentais para o grupo controle (Gcon)**

Para inclusão no grupo controle (Gcon), foram selecionados cães com resultados de hemograma, glicemia<sup>1</sup>, alanina-aminotransferase sérica<sup>2</sup>, fosfatase alcalina sérica<sup>3</sup>, creatinina sérica<sup>4</sup>, ureia sérica<sup>5</sup>, proteínas totais séricas<sup>6</sup>, albumina sérica<sup>7</sup>, urinálise e características líquóricas dentro dos valores de referência para a espécie (JAIN et al; 1993; KANEKO, 2007). Além de resultados negativos para as doenças infecciosas mencionadas e vírus da cinomose. Para descrição dos resultados foi designada a letra “C” para ilustrar cada animal do Gcon.

No total, foram coletadas amostras de 16 animais clinicamente saudáveis, sem histórico de doença recente e apresentando variáveis biológicas, aos exames laboratoriais, dentro dos valores de referência, porém seis destes apresentaram alguma doença excludente (Apêndice A).

#### **4.1.2 Seleção das parcelas experimentais para o grupo cinomose (Gcin)**

Os animais que integram o grupo cinomose (Gcin) foram selecionados com base na história clínica, presença de alteração neurológica (Apêndice B), positividade para o vírus da cinomose e negatividade nos exames para detecção de *Ehrlichia canis*, *Babesia canis*, *Toxoplasma gondii*, *Neospora caninum* e

---

<sup>1</sup> Optium Xceed - ABBOTT Laboratórios do Brasil LTDA

<sup>2</sup> ALT/GPT Liquiform - Labtest Diagnóstica Ltda – Lagoa Santa, MG

<sup>3</sup> Fosfatase Alcalina - Labtest Diagnóstica Ltda – Lagoa Santa, MG

<sup>4</sup> Creatinina - Labtest Diagnóstica Ltda – Lagoa Santa, MG

<sup>5</sup> Ureia UV Liquiform - Labtest Diagnóstica Ltda – Lagoa Santa, MG

<sup>6</sup> Proteínas Totais - Labtest Diagnóstica Ltda – Lagoa Santa, MG

<sup>7</sup> Albumina - Labtest Diagnóstica Ltda – Lagoa Santa, MG

*Leptospira* sp. Ademais, não foram selecionados aqueles que foram ou estavam sendo tratados, para a cinomose, com algum fármaco que possuísse propriedade inibidora das MMPs.

Para constituição dos animais do grupo Gcin, foram coletadas amostras de 27 cães com alteração neurológica e suspeita clínica de cinomose, sendo que apenas 10 foram incluídos no grupo experimental, pois os demais apresentaram doenças concomitantes (Apêndice C).

Para descrição dos resultados foi designada a letra “A” para ilustrar cada animal do Gcin.

## 4.2 Análise físico-química do liquor

O LCR foi obtido por punção da cisterna magna no volume de 1 mL para cada 5 kg de peso corporal (DUCOTÉ; DEWEY, 2006) e acondicionado em microtubo estéril, graduado e sem anticoagulante. Para tanto, utilizou-se medicação pré-anestésica (meperidina na dose de 5mg/kg por via intramuscular) seguida de anestesia geral (propofol na dose de 5mg/kg por via intravenosa).

Imediatamente após a colheita, a amostra de LCR foi submetida à contagem global de células em câmara de Neubauer e determinação das proteínas totais<sup>8</sup>, glicorraquia<sup>9</sup> e albumina. Na sequência, realizou-se a centrifugação do LCR e o sobrenadante foi armazenado a -70°C para posterior determinação das metaloproteinases de matriz. A cota de albumina foi obtida pela seguinte razão:

$$QA = \frac{\text{albumina LCR (mg/dL)}}{\text{albumina sérica (mg/dL)}} \times 100$$

---

<sup>8</sup> Sensiprot Liquiform - Labtest Diagnóstica Ltda – Lagoa Santa, MG

<sup>9</sup> Glicose PAP liquiform - Labtest Diagnóstica Ltda – Lagoa Santa, MG

### 4.3 Quantificação das metaloproteinases de matriz

As concentrações das MMP-2 e -9 foram obtidas pela técnica de zimografia conforme protocolo previamente descrito (BERGMAN et al, 2002) com modificações. Amostras de soro sanguíneo e liquor foram homogeneizadas em solução tampão de dissociação (125M Tris-HCl pH 6.8; 20% glicerol; 4% dodecil sulfato de sódio - SDS; 0,2% azul de Bromofenol) por cinco minutos a temperatura ambiente e submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida copomerizada a 10% utilizando-se um sistema vertical.

Para o preparo do gel utilizaram-se 4mL de gelatina tipo A<sup>10</sup> (1mg/mL), 3,3mL de acrilamida/bisacrilamida (30:0,8), 2,5mL de tris-HCl pH 8,8 (1M), 100µL de SDS (1%) e a polimerização foi possível pela adição de 4µL de N, N, N', N'-tetrametiletilenodiamina (TEMED).

As placas de vidro contendo os géis foram colocadas em cuba específica com tampão de corrida pH 8,3. Este tampão é constituído por 30,2g de tris base 250mM, 144g de glicina 1,92M, 10g de dodecil sulfato de sódio (SDS) 1% e 1000mL de água destilada. Ato contínuo, as amostras foram pipetadas e a corrida iniciada, durante duas horas e trinta minutos a 125V e 40mA.

Após a eletroforese, os géis foram lavados em solução Triton X-100 (2,5%) por 30 minutos a temperatura ambiente, sob constante agitação, seguido de incubação em tampão de ativação enzimática pH 7,6 (6,057g de Tris 50mM; 1,11g de CaCl<sub>2</sub> 10mM; 2 g de Brij-35<sup>®</sup> 0,2% e 1000ml de água destilada) por 20 horas em estufa a 37°C. Em seguida, foram corados pela solução azul de Comassie<sup>11</sup> 0,5% (1g de azul de Comassie R250 0,5% e 200mL de solução fixadora) por 30 minutos sob agitação. A solução fixadora e também descorante, é constituída de 500mL de álcool metílico, 100mL de ácido acético glacial e 400mL de água destilada. Após a coloração, os géis foram descorados por 40 minutos, também sob constante agitação.

Como controle positivo para identificação das MMPs e adequações dos géis, foi empregada uma amostra de adenocarcinoma mamário canino previamente

<sup>10</sup> G8150-100G, Sigma<sup>®</sup>, St Louis-MO, EUA

<sup>11</sup> Coomassie Brilliant Blue R250 Dye, Pierce<sup>®</sup>, Rockford-IL, EUA

padronizado (MELO et al., 2011) com a MMP-2 recombinante humana<sup>12</sup> e a MMP-9 recombinante humana<sup>13</sup>.

Cada gel foi digitalizado e as densidades integradas das bandas, expressas por unidades arbitrárias, foram calculadas utilizando-se do programa ImageJ 1.47v<sup>14</sup>.

#### 4.4 Análise dos resultados

Devido à estrutura de dependência contida no conjunto original de variáveis, os dados foram submetidos a técnicas exploratórias multivariadas de agrupamento e de componentes principais. A análise de agrupamento por método hierárquico foi processada com a distância euclidiana para medir a semelhança entre os animais e o método de Ward como método de ligação de grupos. A análise de agrupamento por método não hierárquico foi processada com o algoritmo k-médias enquanto que a análise de componentes principais foi processada com a matriz de covariância obtida com as variáveis originais. Os componentes principais são os autovetores construídos com os autovalores da matriz de covariância e são combinações lineares entre as variáveis originais. São ortogonais e preservam a máxima variância contida nas variáveis originais. Gráficos bidimensionais denominados de biplot, que representam, ao mesmo tempo, os animais e a estrutura de dependência contida nas variáveis, foram construídos para melhor compreender os resultados em dimensões menores projetadas de hiperplanos complexos. Nesses planos bidimensionais, os animais (ou grupos) com propriedades específicas tendem a se localizar nos extremos dos autovetores (HAIR, et al, 2005). Após a padronização das variáveis, todas passaram a ter média nula e variância unitária.

Com a finalidade de investigar como uma variável age de forma independente, realizou-se teste estatístico para comparar as diferenças entre os grupos, com relação as concentrações de MMP-2 e -9 séricas e líquóricas,

---

<sup>12</sup> PF037 Calbiochem

<sup>13</sup> PF038 Calbiochem

<sup>14</sup> ImageJ 1,37v, Wayne Rasband - National Institutes of Health, USA, rsb.info.nih.gov/ij

contagem total de células nucleadas no liquor, albumina liquórica e cota de albumina. Para tanto, tais variáveis foram previamente testadas quanto a normalidade estatística com base no teste de Kolmogorov-Smirnov, seguido de teste *t* não pareado. Diferenças foram consideradas significativas quando  $p < 0,05$ . Os resultados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão. Todas as análises foram processadas no pacote estatístico Statistica, versão 7.

## 5. RESULTADOS

Na tabela 1 acham-se apresentados valores individuais, médias e respectivos erros padrões para celularidade, proteínas totais e glicose líquóricas, bem como para glicose sanguínea obtidas para animais controle e portadores de cinomose na fase nervosa. No grupo Gcin, oito dos 10 animais apresentaram contagem total de células nucleadas acima dos valores de referência para a espécie e nove de 10 aumento da proteína no liquor. Os cães desse grupo também tiveram níveis glicêmicos e de glicorraquia maiores quando comparados ao grupo Gcon, porém mantendo-se dentro ou próximos dos valores de referência para a espécie (Apêndice D).

Tabela 1. Valores individuais, médias e respectivos erros padrões para a celularidade, proteínas totais e glicose líquóricas bem como para a glicose sanguínea de cães do grupo controle (Gcon) e grupo cinomose (Gcin). Jaboticabal, 2014.

Animal	Contagem total de celular (célula/ $\mu$ L)		PT* (mg/dL)		Glicorraquia (mg/dL)		Glicemia (mg/dL)	
	Gcon	Gcin	Gcon	Gcin	Gcon	Gcin	Gcon	Gcin
C1/A1**	5,0	5,0	12,0	61,6	68,0	63,0	96,0	71,0
C2/A2	2,0	40,0	12,0	107,4	69,0	77,4	71,0	72,0
C3/A3	2,0	48,0	30,7	17,7	60,0	78,0	76,0	94,0
C4/A4	6,0	5,0	11,2	20,9	56,0	92,1	70,0	130,0
C5/A5	0,0	19,0	14,3	136,5	58,0	73,3	67,0	77,0
C6/A6	2,0	40,0	27,2	62,1	66,0	105,7	77,0	120,0
C7/A7	1,0	34,0	17,6	87,4	65,0	34,7	89,0	51,0
C8/A7	5,0	133,0	21,7	178,0	63,0	91,4	75,0	105,0
C9/A9	2,0	26,0	19,3	86,6	68,0	58,0	87,0	77,0
C10/A10	4,0	58,0	13,2	115,9	58,0	91,0	78,0	104,0
Média	2,90	50,8	17,92	87,4	63,10	76,5	78,60	90,1
$\pm$ EPM	$\pm$ 0,62	$\pm$ 15,27	$\pm$ 2,15	$\pm$ 15,78	$\pm$ 1,51	$\pm$ 6,51	$\pm$ 2,93	$\pm$ 7,80

\*PT=Proteína total; \*\* C1 a C10 = animais do grupo controle; A1 a A10 = animais do grupo cinomose.

Os valores individuais, médias e respectivos erros padrões, obtidos para a albumina sérica, albumina líquórica e cota de albumina (QA) dos grupos Gcon e Gcin encontram-se explicitadas na Tabela 2. Considerando-se que valores iguais ou menores que 2,5 ( $\leq 2,5$ ), para QA, situam-se dentro da normalidade, verifica-se, com base nos resultados da referida Tabela 2, que três de 10 animais do grupo Gcin exibiram valores aumentados para a QA (Apêndice D).

Tabela 2. Valores individuais, médias e respectivos erros padrões para a albumina sérica e líquórica, e cota de albumina (QA), em cães do grupo controle (Gcon) e grupo cinomose (Gcin). Jaboticabal, 2014.

Animal	Albumina sérica (mg/dL)		Albumina LCR (mg/dL)		QA	
	Gcon	Gcin	Gcon	Gcin	Gcon	Gcin
C1/A1*	2840,00	2480,00	60,00	40,00	2,11	1,61
C2/A2	3330,00	2250,00	10,00	0	0,30	0
C3/A3	3180,00	2600,00	0	100,00	0	3,85
C4/A4	3510,00	2940,00	50,00	10,00	1,42	0,34
C5/A5	3240,00	3460,00	0	80,00	0	2,31
C6/A6	3180,00	2070,00	0	10,00	0	0,48
C7/A7	3610,00	2830,00	0	40,00	0	1,41
C8/A8	3170,00	3150,00	0	150,00	0	4,76
C9/A9	2710,00	2170,00	0	20,00	0	0,92
C10/A10	2510,00	3400,00	0	140,00	0	4,12
Média	3128,00	2135,00	12,00	59,00	0,38	1,98
±EPM	±109,46	±158,85	±7,27	±17,48	±0,24	±0,54

\* C1 a C10 = animais do grupo controle; A1 a A10 = animais do grupo cinomose.

## 5.1 Metaloproteinase de matriz

Zimografias representativas de amostras líquóricas e séricas estão ilustradas na Figura 1. Nos ensaios zimográficos foram observadas atividades gelatinolíticas relacionadas às enzimas com pesos moleculares de 92KDa, relativa a forma inativa

da MMP-9 (próMMP-9), de 86kDa, forma ativa da MMP-9, de 72kDa, próMMP-2 e de 66kDa, referente à MMP-2 ativa

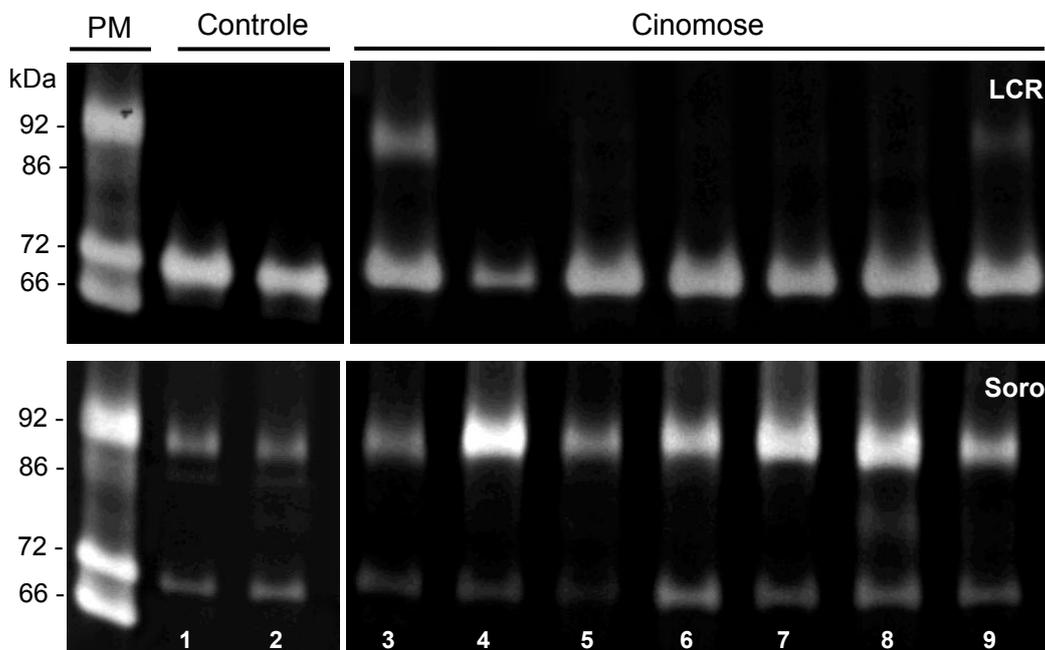


Figura 1. Zimografia de líquido cefalorraquidiano (LCR) e soro em gel de poliacrilamida 10%. Padrão de peso molecular (PM) em animais do grupo controle (1 e 2) e cinomose (3 – 9). Atividades gelatinolíticas das próMMP-9 (92kDa); MMP-9 (86kDa); próMMP-2 (72kDa); MMP-2 (66kDa).

Os valores individuais, médias e respectivos erros padrões, obtidos no liquor e soro de cães controle (Gcon) e portadores de cinomose na fase nervosa (Gcin), para as metaloproteínases de matriz 2 e 9, acham-se explicitados respectivamente nas Tabelas 3 e 4.

No liquor foi identificada atividade gelatinolítica referente à próMMP-2 nos 10 animais do grupo Gcon e a MMP-2 ativa em apenas um cão. No grupo Gcin detectou-se atividade gelatinolítica da próMMP-2 em todos os animais e da próMMP-9 em dois animais.

Tabela 3. Valores individuais, médias e respectivos erros padrões das próMMP-2 e MMP-2 em liquor e soro de cães do grupo controle (Gcon) e grupo cinomose (Gcin). Jaboticabal, 2014.

Animal	próMMP-2 Liquor		MMP-2 Liquor		próMMP-2 Soro	
	Gcon	Gcin	Gcon	Gcin	Gcon	Gcin
C1/A1*	0,53	2,64	-	-	0,28	0,20
C2/A2	0,55	0,82	-	-	0,21	0,19
C3/A3	0,55	3,00	-	-	0,14	0,12
C4/A4	0,46	2,82	-	-	0,17	0,39
C5/A5	0,48	2,28	-	-	0,07	0,25
C6/A6	0,37	3,25	-	-	0,13	0,34
C7/A7	1,42	2,83	-	-	0,12	0,23
C8/A8	1,14	2,39	0,13	-	0,17	0,10
C9/A9	0,91	0,13	-	-	0,07	0,91
C10/A10	0,58	1,36	-	-	0,08	0,22
Média	0,70	2,15	-	-	0,14	0,29
±EPM	±0,11	±0,33	-	-	±0,02	±0,07

\* C1 a C10 = animais do grupo controle; A1 a A10 = animais do grupo cinomose.

Tabela 4. Valores individuais, médias e respectivos erros padrões das próMMP-9 e MMP-9 em liquor e soro de cães do grupo controle (Gcon) e grupo cinomose (Gcin). Jaboticabal, 2014.

Animal	próMMP-9 Liquor		próMMP-9 Soro		MMP-9 Soro	
	Gcon	Gcin	Gcon	Gcin	Gcon	Gcin
C1/A1*	-	1,64	0,35	0,35	0,03	-
C2/A2	-	-	0,23	1,38	0,05	-
C3/A3	-	-	0,27	0,49	0,04	-
C4/A4	-	-	0,13	1,01	0,03	-
C5/A5	-	-	0,26	1,26	0,02	-
C6/A6	-	-	0,25	1,33	0,04	-
C7/A7	-	0,52	0,32	0,72	0,03	-
C8/A8	-	-	0,26	0,85	0,04	-
C9/A9	-	-	0,19	0,82	0,04	-
C10/A10	-	-	0,35	1,01	0,02	-
Média	-	-	0,26	0,92	0,03	-
±EPM	-	-	±0,26	±0,11	±0,00	-

\* C1 a C10 = animais do grupo controle; A1 a A10 = animais do grupo cinomose.

Nas amostras de soro, não se obteve atividade gelatinolítica referente à MMP-2 em ambos os grupos.

O grupo Gcon apresentou atividade das formas pró (92kDa) e ativa (86kDa) da MMP-9 e da próMMP-2 em todos os animais, enquanto o grupo Gcin demonstrou apenas atividade para a próMMP-2 e próMMP-9 para todas as amostras.

Os valores numéricos obtidos para as MMP-2 e -9 encontram-se listados nas Tabelas 3 e 4.

A Figura 2 ilustra a mediana da atividade gelatinolítica das MMPs detectadas em líquor e soro de cães do grupo Gcon e Gcin.

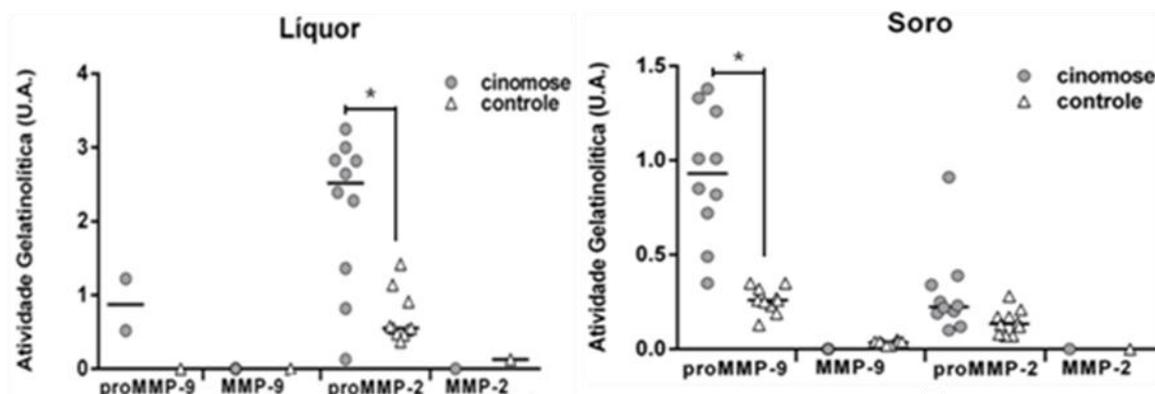


Figura 2. Distribuição das próMMP-2, MMP-2, próMMP-9 e MMP-9 de amostras de líquor e soro de cães dos grupos controle e com cinomose. A linha horizontal representam as medianas em relação á intensidade das unidades inversas de densidade óptica (unidades arbitrárias – U.A.) a partir das bandas gelatinolíticas. \* Indica os valores de  $p < 0,05$ .

## 5.2 Análise estatística multivariada exploratória

O dendrograma resultante da análise de agrupamento por método hierárquico (Figura 3) mostra que há uma separação dos animais em dois grandes grupos, de acordo com os padrões de animais doentes e saudáveis, sendo que em um grupo concentraram-se os animais do Gcin e no outro, do Gcon, ou seja, o padrão

dos animais doentes foi distinto dos não doentes de acordo com as variáveis estudadas.

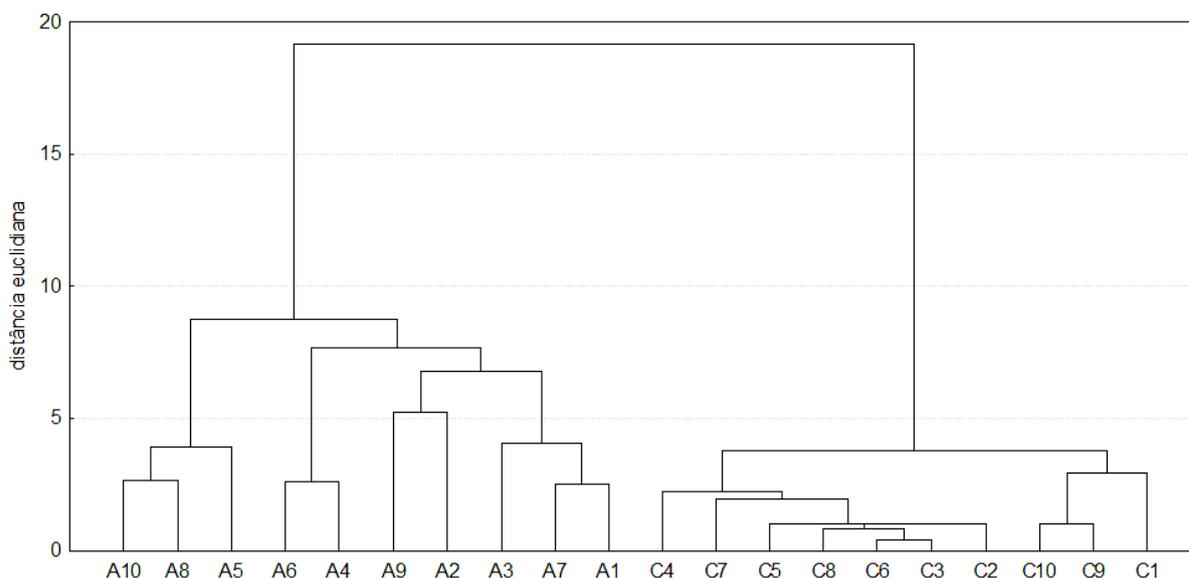


Figura 3. Dendrograma evidenciando separação dos grupos controle (Gcon) e cinomose (Gcin), sendo A= animais do grupo Gcin e C= animais do grupo Gcon.

Em complemento, a análise de agrupamento pelo método não hierárquico, processada com o algoritmo k-médias, mostra o perfil dos centróides (médias das variáveis) dos grupos Gcon e Gcin (Figura 4) e quais variáveis discriminam os dois grupos que o dendrograma evidenciou. Observa-se que tanto a albumina quanto a próMMP-2 séricas não contribuem para discriminar os grupos por possuírem basicamente a mesma média, porém todas as outras variáveis contribuem na discriminação entre os grupos. O centróide do grupo Gcin, conforme Figura 4, apresentou valores acima da média enquanto que o centróide do grupo Gcon apresentou valores abaixo da média.

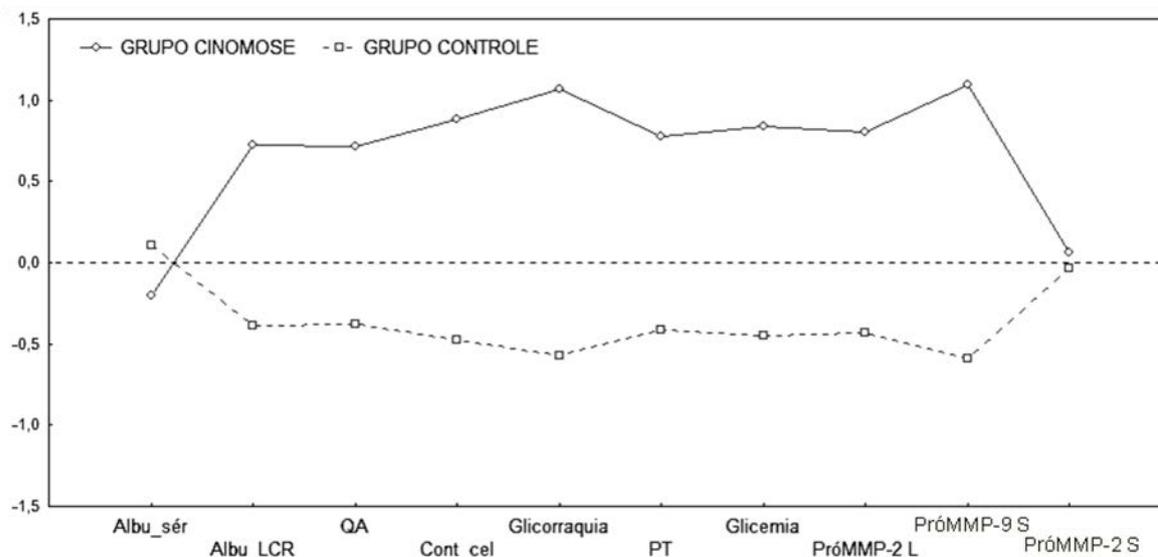


Figura 4. Centróides dos grupos controle (Gcon) e cinomose (Gcin) por análise de agrupamento por método não hierárquico.

A análise de componentes principais (CP) conseguiu reter em dois componentes 61,41% (42,61% em CP1 e 18,80% em CP2) da variabilidade contida no conjunto original de variáveis (Figura 5).

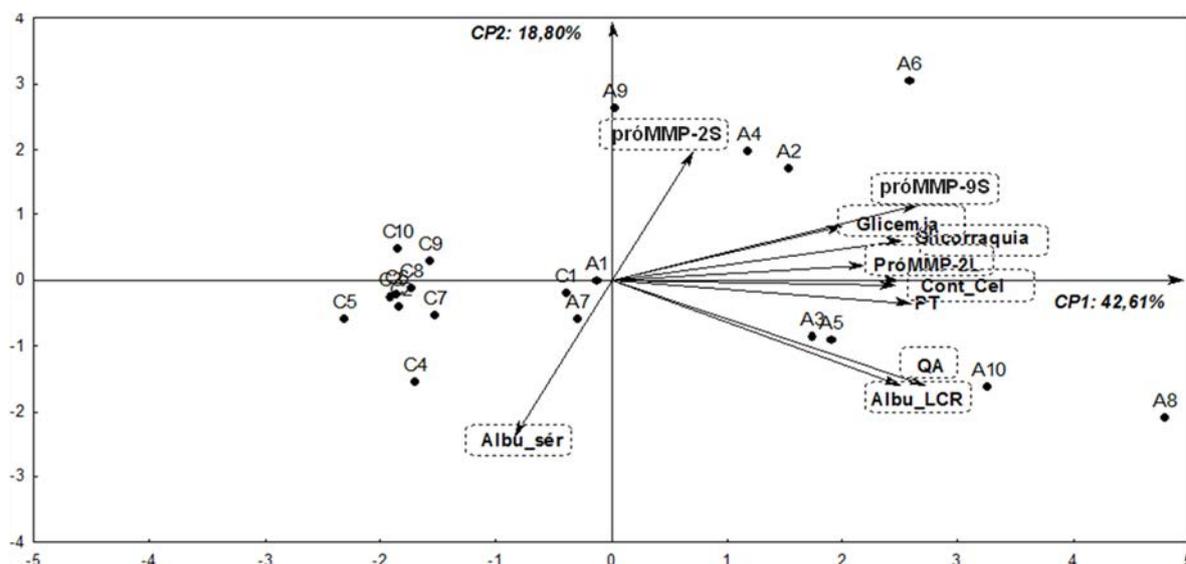


Figura 5. Gráfico biplot formado pelos maiores autovetores CP1 e CP2, demonstrando a relação entre as variáveis próMMP-2 no soro (próMMP-2S), próMMP-9 no soro (próMMP-9S), glicemia, glicorraquia, próMMP-2 no liquor (próMMP-2L), contagem células nucleadas no liquor (cont\_Cel), proteína total no liquor (PT), cota de albumina (QA), albumina no liquor (Albu\_LCR) e albumina sérica (Albu\_sér) em cada animal (grupo controle = C1-C10; grupo cinomose A1-A10).

No biplot da Figura 5, observa-se que animais com cinomose localizam-se a direita enquanto animais saudáveis se localizam a esquerda, sendo por isso o primeiro componente principal responsável pela discriminação dos animais do grupo controle (Gcon) e dos animais doentes (Gcin). Os animais A1, A7 e C1 não apresentaram características específicas e, por isso, se localizaram na região central do biplot.

As variáveis com poder discriminatório, segundo valores decrescentes (Quadro 1) no primeiro componente principal, foram a próMMP-9 sérica, proteína total liquórica, contagem de células nucleadas, albumina do liquor, QA, glicorraquia, próMMP-2 liquórica e glicemia. Todas as variáveis apresentaram o mesmo sinal, indicando associação direta entre elas, ou seja, quando o valor de uma aumenta (ou diminui) o da outra também aumenta (ou diminui). Como todas as variáveis apresentaram cargas positivas, indicam associação com animais localizados à direita (cinomose). Assim, essas variáveis caracterizam um padrão existente entre animais doentes.

Quadro 1. Poder discriminatório das variáveis – correlação entre cada variável e um componente principal. Demonstra a medida do gráfico Biplot. Os destaques em negrito mostram as variáveis com poder discriminatório.

	CP1	CP2
PróMMP-2 soro	0,176161	<b>0,612316</b>
Albumina soro	-0,210244	<b>-0,752591</b>
Albumina liquor	<b>0,747982</b>	<b>-0,578874</b>
Cota de albumina	<b>0,747799</b>	<b>-0,535350</b>
Contagem células nucleadas no liquor	<b>0,752022</b>	-0,024187
Glicorraquia	<b>0,726141</b>	0,231702
Proteína total	<b>0,78902-</b>	-0,127834
Glicemia	<b>0,581621</b>	0,278530
próMMP-2 líquor	<b>0,623832</b>	0,055325
PróMMP-9 soro	<b>0,790056</b>	0,406959

No segundo componente principal, as variáveis com poder discriminatório foram a próMMP-2 sérica, albumina sérica, albumina líquórica e QA. As variáveis albumina sérica, albumina líquórica e QA possuem cargas negativas, informando que quanto mais abaixo no biplot da Figura 5 os animais se localizarem, maior valor terão dessas variáveis. A variável próMMP-2 sérica possui carga positiva, indicando maiores valores para os animais localizados acima do biplot da Figura 5 .

A variável próMMP-2 sérica apresentou associação apenas com alguns animais doentes, enquanto que as variáveis próMMP-2 líquórica e a próMMP-9 sérica apresentaram associação com o grupo cinomose.

### 5.3 Análise estatística univariada

Com referência às MMPs, verificou-se aumento significativo na próMMP-2 do liquor dos animais do grupo Gcin comparados ao grupo Gcon ( $p < 0,05$ ), tal como

o aumento verificado na próMMP-9 no soro do grupo Gcin. Não houve diferença entre os grupos nos valores da próMMP-2 sérica (Tabela 5).

Constatou-se, também, diferença entre a contagem celular, proteínas totais, albumina e QA líquóricas entre os grupos ( $p < 0,05$ ), as quais estavam aumentadas nos animais do grupo Gcin.

Não houve diferença estatística na glicemia e glicorraquia entre os grupos.

Tabela 5. Comparação entre os grupos controle (Gcon) e cinomose (Gcin) com relação às diferentes variáveis avaliadas com suas respectivas médias  $\pm$  erro padrão da média, valores de p e índice de confiança (IC). Jaboticabal, 2014.

Variável	Grupo Gcon	Grupo Gcin	p	IC 95%
próMMP-2 liquor	0,699 $\pm$ 0,108	2,152 $\pm$ 0,327	0,0005	0,728 - 2,177
próMMP-2 soro	0,144 $\pm$ 0,021	0,295 $\pm$ 0,073	0,064	-0,010 - 0,312
próMMP-9 soro	0,261 $\pm$ 0,021	0,922 $\pm$ 0,109	0,0001	0,426 - 0,895
Contagem celular (células/ $\mu$ L)	2,900 $\pm$ 0,622	50,800 $\pm$ 15,272	0,0057	15,786 - 80,013
PT* (mg/dL)	17,920 $\pm$ 2,150	87,410 $\pm$ 15,782	0,0004	30,025 - 102,954
Albumina no liquor (mg/dL)	12,000 $\pm$ 7,272	59,000 $\pm$ 17,477	0,023	7,230 - 86,769
QA*	0,383 $\pm$ 0,237	1,980 $\pm$ 0,541	0,014	0,355 - 2,839
Glicorraquia	63,100 $\pm$ 1,516	76,460 $\pm$ 6,509	0,060	-0,681 - 27,401
Glicemia	78,600 $\pm$ 2,925	90,100 $\pm$ 7,803	0,184	-6,009 - 29,009

\*PT=Proteína total; QA=Cota de albumina

## 6. DISCUSSÃO

O presente estudo avaliou as mudanças que ocorreram na composição do líquido cefalorraquidiano (LCR) de cães portadores da cinomose na fase neurológica e quantificou, quando presente, os valores das metaloproteinases de matriz (MMPs) 2 e 9 no LCR e soro nessa condição. Ademais, os animais doentes foram caracterizados pela análise estatística multivariada exploratória, sendo possível verificar a estrutura de dependência existente entre as variáveis que contribuíram para essa caracterização.

A análise estatística multivariada exploratória permitiu distinguir padrões diferenciados no comportamento dos animais com cinomose comparado aos cães hígidos, de acordo com as variáveis estudadas. Essa observação foi possível a partir de três análises (análises de agrupamentos e análise de componentes principais), cujos resultados obtidos foram concordantes entre eles.

Ao ponderar o perfil dos centróides da análise de agrupamento pelo método não hierárquico, foi possível identificar as variáveis discriminantes (glicorraquia, contagem total de células nucleadas do liquor, albumina líquórica, proteína total líquórica, cota de albumina, próMMP-2 do liquor, próMMP-9 sérica e glicemia), que contribuíram na separação dos dois grupos explicitados no dendrograma, enquanto que na análise de componentes principais permitiu-se avaliar a estrutura de dependência dessas variáveis para cada animal.

No Biplot, observou-se que os cães com cinomose (lado direito do gráfico), ficaram mais dispersos, diferente dos cães do grupo controle (lado esquerdo do gráfico) que ficaram mais concentrados e próximos entre si. Essa característica de distribuição heterogênea, provavelmente, se deve à fase da lesão neurológica em que o animal se encontrava no momento da coleta das amostras avaliadas, bem como as diferentes respostas individuais frente à doença. Ainda, foi possível verificar que as variáveis com poder discriminatório do CP1, as quais se relacionam com os cães portadores de cinomose, estão associadas à condição de inflamação pela presença da doença ainda ativa.

Com o propósito de avaliar o comportamento isolado das variáveis as quais discriminaram animais doentes de sadios, com foco nos aspectos líquóricos e das

MMPS, realizou-se teste *t* não pareado, o qual permitiu averiguar as possíveis diferenças entre os grupos.

Os dados obtidos para a glicorraquia não diferiram estatisticamente ( $p=0,060$ ) entre os grupos controle (Gcon) e cinomose (Gcin), assim como constatado por Gama et al. (2005). Todavia, quando a observamos pela análise estatística multivariada exploratória, é possível identificar seu poder discriminatório, mesmo que baixo (Quadro 1), nos animais do Gcin quando em conjunto com as demais variáveis analisadas (Figuras 4 e 5). Isto é, por essa avaliação foi possível observar sua associação na doença quando estudada em conjunto com as demais variáveis devido à estrutura de dependência existente.

Com relação à contagem total de células nucleadas no liquor, observou-se que nos animais do grupo Gcon a celularidade não ultrapassou 6 células/ $\mu\text{L}$ , contagem essa descrita por autores como Fernandes (1990); Gama et al. (2005); Di Terlizzi; Platt (2009) como valores dentro da referência para a espécie. Já no grupo Gcin, a contagem variou entre 5 e 133 células/ $\mu\text{L}$  o que diferiu significativamente do grupo Gcon ( $p=0,0057$ ). Assim como Gama et al. (2005), considerou-se pleocitose aquelas amostras as quais apresentaram mais de 8 células/ $\mu\text{L}$ , desse modo, 80% dos animais do grupo Gcin apresentaram pleocitose. Gama et al. (2005), também identificaram contagem de células nucleadas dentro do valor de referência em cães com cinomose na fase neurológica, fato constatado em 20% dos animais estudados nessa pesquisa, provavelmente pelos diferentes estágios de evolução da lesão no SNC nos pacientes, o que também não foi possível ser determinado nesse estudo. Tal aumento ocorre pela passagem de leucócitos provenientes do sangue periférico, através da barreira hematoencefálica (BHE) devido estímulo inflamatório iniciado no SNC (ROE et al., 2012).

A determinação dos níveis proteicos totais no liquor dos animais do grupo Gcon coincidiu com os encontrados por Fernandes (1990); Gama et al. (2005); Kim et al. (2008). Já naqueles do grupo Gcin, observou-se aumento significativo do componente proteico ( $p=0,0004$ ) como citado por Tudury et al. (1997); Gama et al. (2005) em cães com encefalite causada pelo vírus da cinomose. Ainda, Gama et al. (2007) encontram aumento nos valores de albumina, alfa, beta e gama-globulinas na eletroforese do liquor de cães na fase neurológica da afecção. A tal achado, presume-se que esse aumento seja devido à quebra da BHE causada pela lesão

no SNC, a qual permite a passagem de proteínas advindas do plasma e/ou pela síntese local de globulinas (TIPOLD et al., 1994).

Associada as características de celularidade e proteínas líquóricas, a cota de albumina também evidenciou a integridade da BHE. No presente estudo, a média de QA no liquor de animais do Gcin foi maior que no Gcon, porém abaixo do limiar que indica quebra da BHE. Ainda no Gcin, três cães demonstraram valores acima de 2,35 indicando lesão na referida barreira. Por ser a albumina sintetizada exclusivamente no fígado, um aumento na concentração dessa proteína no liquor ocorre devido a um dano da barreira, que permite sua passagem do plasma para o liquor (GAMA et, al.; 2005; DI TERLIZZI; PLATT, 2008). A quantidade de albumina presente no LCR pode variar de acordo com sua concentração plasmática, por isso a avaliação da integridade da BHE a partir desse índice (QA) é mais confiável do que avaliar a concentração líquórica isoladamente (KIM et al., 2008). Acredita-se que a  $QA > 2,35$  nos três cães do Gcin tenha ocorrido devido à característica da doença neurológica ser fase dependente, ou seja, é provável que nesses cães o processo de lesão à BHE estivesse ativo, mas também deve-se considerar os fatores relacionados a imunocompetência do hospedeiro e o grau de virulência segundo estirpe viral.

A análise das MMP-2 e MMP-9 pela zimografia permitiu a identificação dessas enzimas a partir de seus pesos moleculares e foi sensível o suficiente para permitir a distinção entre as formas pró e ativas das enzimas (Kleiner and Stetler-Stevenson, 1994).

De acordo com Bergman et al. (2002), a próMMP-2 é normalmente encontrada no LCR de cães hígidos, assim como pequenas quantidades de sua forma ativa, dados esses que correspondem com os encontrados no grupo Gcon, em que todos os animais apresentaram a próMMP-2 e apenas um cão uma fina banda da forma ativa. A próMMP-2 também foi detectada no grupo Gcin e apresentou aumento significativo em relação ao grupo Gcon ( $p=0,0005$ ), o mesmo encontrado por Machado et al. (2013). Esses autores encontraram aumentos simultâneos nas próMMP-2 em cerebelo, pedúnculo cerebelar e LCR de cães na fase subaguda da lesão desmielinizante e poucas quantidades da forma ativa no LCR de alguns animais, provavelmente pela alta concentração dos inibidores

teciduais de metaloproteínas de matriz (TIMPs) presentes nessa fase da lesão (MIAO et al., 2003).

Ao analisar o gráfico Biplot, verificamos a associação da próMMP-2 do líquor com a contagem total de células nucleadas e proteínas totais líquóricas. Então, pode-se sugerir que o aumento da próMMP-2 nos cães com cinomose seja proveniente das células inflamatórias que migraram para o SNC. Também na análise de componentes principais, observa-se a falta de associação entre a próMMP-2 sérica com a líquórica, o que permite, de acordo com os animais estudados, inferir a falta de relação existente entre elas.

Roe et al. (2012) sugerem que vírus neurotrópicos adentram o SNC com a BHE ainda íntegra e sua replicação induz inflamação local incluindo a produção de MMPs (MMP-1, -3, -9) e citocinas que causam a ruptura da BHE, o que suporta a hipótese que, devido a esses eventos, ocorra o aumento na infiltração de células inflamatórias para o tecido nervoso, algumas das quais infectadas pelo vírus neurotrópico, facilitando assim a segunda rota da neuroinvasão viral e a infiltração irrestrita de leucócitos no SNC. Por sua vez, Miao et al. (2003) detectaram, pela imunistoquímica, aumento na quantidade de MMP-9 nas fases aguda e subaguda da cinomose na ausência de infiltrado inflamatório no SNC, com decréscimo em sua quantificação conforme progressão da doença. Além disso, nesses dois estudos observa-se que a MMP-2 se manteve inalterada no tecido encefálico (níveis constitucionais) durante a todo o processo do dano neurológico, o mesmo encontrado por Kolb et al. (1998) e Mun-bryce; Rosenberg (1998). Roe et al. (2012), não constataram alterações na quantidade do inibidor tecidual da MMP-2 (TIMP-2), ao contrário de Miao et al. (2003) que detectaram aumento da TIMP-2 nas fases aqui mencionadas, fatores que podem explicar a ausência da forma ativa da MMP-2 no LCR dos cães do presente estudo

No LCR, a MMP-9 está presente somente nos processos patológicos (KOLB et al., 1998). Deve-se considerar que a fraca ou forte produção de MMP-9 pode ser diferenciada dependendo do tipo de célula que adentra o SNC. Os granulócitos e macrófagos são fortes produtores dessa enzima, ao contrário dos linfócitos que as produzem em menores quantidades (YUSHCHENKO, 2000). Assim, diferentes citologias do LCR em diversas condições de doenças neurológicas podem influenciar os níveis de MMP-9. Por exemplo, na meningite bacteriana geralmente

ocorre penetração de granulócitos no LCR, prováveis responsáveis pelos altos níveis dessa enzima encontrados nesta doença (GIJBELS et al., 1992; LEPPERT et al., 2000). Nas meningoencefalites virais e na neuroborreliose um aumento relativo na infiltração de linfócitos no LCR causou baixo ou moderado aumento nos níveis de MMP-9 (KOLB et al., 1998; PERIDES et al., 1998). Apesar do estudo citológico não ter sido realizado no presente trabalho, outros como os de Tudury et al., (1997); Amude, (2005); Gama et al., (2005), mostraram que na encefalite causada pelo vírus da cinomose, a citologia do liquor foi caracterizada pelo predomínio de linfócitos, fato que pode justificar a quantificação da próMMP-9 em apenas dois animais de nosso estudo e nenhuma forma ativa desta enzima. Ressalta-se o possível envolvimento da TIMP-1 (inibidor da MMP-9) na inibição da ativação da MMP-9 e a fase do dano neurológico de cada animal avaliado nesse estudo, pois como demonstrado por Miao et al. (2003), a MMP-9 e a TIMP-1 foram encontradas em maiores quantidades na fase inicial da lesão e decresceram conforme evoluíam para a cronicidade.

No soro dos cães com cinomose, a próMMP-2 manteve-se semelhante entre os grupos enquanto que no LCR apresentou maiores valores apenas no grupo Gcin. Destarte, presume-se que esse incremento seja um reflexo do influxo de células inflamatórias para o SNC e/ou pela produção no tecido nervoso, e não do aumento da atividade dessa enzima no LCR nos animais estudados. Melo et al. (2011), ao estudar a atividade das MMPs no soro de cães com leishmaniose visceral, detectaram níveis séricos elevados das MMP-2 e -9 e, segundo Maragoni et al. (2011), esse incremento não teve correlação com os níveis das mesmas no LCR. Essa evidência sugere que essas MMPs no liquor não foram originadas do soro e sim produzidas dentro do ambiente nervoso.

Essa mesma hipótese se aplica à próMMP-9 sérica, que se mostrou aumentada no soro do Gcin e ausente no LCR. Sendo a cinomose uma doença multissistêmica, não é possível descartar a inexistência de uma inflamação sistêmica ou localizada, bem como a existência da reparação tecidual de algum órgão previamente lesado. O critério na seleção dos animais incluiu aqueles com alguma manifestação neurológica e por mais que o exame físico e laboratorial tenha sido realizado para averiguar qualquer infecção secundária existente, é possível que algum cão estivesse com, por exemplo, alguma infecção subclínica ou

em recuperação desta. Ademais, alguns animais apresentavam secreção ocular, hiperqueratose nasal e/ou em coxins e presença, com alguma intensidade, de proteína na urina detectada pelo teste de fita reagente. Koutinas et al. (2004), demonstraram que cães com e sem lesões de hiperqueratose, na presença ou ausência de alteração neurológica, apresentaram expressão do antígeno viral em epiderme, derme e glândulas sudoríparas écrinas. Okita et al., (1997), avaliaram a histologia de diversos tecidos e encontraram inclusões virais em pelve renal e bexiga urinária, entre outros. Autores na área de nefrologia relatam o envolvimento das MMP-2 e -9 em afecções renais (SEKIUCHI et al., 2012; TAN; LIU, 20012; ZAKIYANOV et al., 2013), ou seja, não é possível afirmar que o aumento da próMMP-9 sérica esteja relacionado com a lesão encefálica. Destarte, nas condições do presente estudo, não foi possível excluir qualquer outro processo que pudesse interferir nas quantidades dessas enzimas no soro. A ausência da MMP-9, mesmo na suposição de inflamação sistêmica ou localizada, pode decorrer do aumento na TIMP-1, ensaio que não foi realizado neste trabalho.

Finas bandas da MMP-9 foram encontradas no soro dos cães do Gcon e em nenhum do Gcin. Na literatura, é fato estabelecido que as metaloproteinases desempenham atividades gelatinolíticas tanto no estado fisiológico como patológico do organismo. São proteínas produzidas pelo processo de transcrição e liberadas na maior parte para o meio extracelular, onde são ativadas por mecanismos específicos e exercem suas funções principais e secundárias (MCCAWLEY; MATRISIAN, 2001).

O estudo em tela indica um importante componente na perda de integridade da BHE facilitando a migração de células inflamatórias, infectadas ou não, para o SNC e, assim, a evolução da doença. A inibição da quebra dessa barreira pode não bloquear a invasão viral para esse sistema, mas é provável que reduza a lesão neurológica associada à entrada irrestrita de mais agentes virais e leucócitos no tecido nervoso. Embora as células T sejam específicas para a depuração viral, o excesso de seu infiltrado pode potencializar a inflamação e agravar a lesão ao SNC resultando em prognóstico ruim ao paciente.

## 7. CONCLUSÕES

Nas condições desse ensaio e diante os resultados obtidos, analisados e interpretados pode-se concluir que:

- As MMP-2 e MMP-9 séricas não apresentam correlação com as do liquor.
- O aumento da próMMP-2 no LCR não indicou lesão ativa da BHE, porém relacionou-se com a perda de sua integridade.
- A análise estatística multivariada exploratória permitiu distinguir padrões diferenciados no comportamento dos animais com cinomose comparado aos cães hípidos, de acordo com as variáveis estudadas.
- As variáveis glicorraquia, próMMP-2, proteína total, contagem total de células nucleadas, albumina e QA liquóricas, assim como a próMMP-9 sérica e glicemia apresentam correlação direta e valores aumentados caracterizam animais com inflamação sistêmica e no SNC.

## 8. REFERÊNCIAS

ABBOTT, N. J.; PATABENDIGE, A. A.; DOLMAN, D. E.; YUSOF, S.R.; BEGLEY, D. J. Structure and function of the blood-brain barrier. **Neurobiology Disease**, v.37, n.1, p.13–25, 2010.

AMUDE, A. M. **Avaliação neurológica e laboratorial de casos de encefalomielite pelo vírus da cinomose canina na ausência de sinais sistêmicos e mioclonia**. 2005. 112f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2005.

AMUDE, A. M.; ALFIERI, A. A.; ALFIERI, A. F. Clinicopathological findings in dogs with distemper encephalomyelitis presented without characteristic signs of the disease. **Research in Veterinary Science**, v.82, n.3, p.416–422, 2007.

AMUDE, A. M.; ALFIERI, A. A.; ARIAS, M. V. B.; ALFIERI, A. F. Clinical syndromes of nervous distemper in dogs initially presented without conventional evidences of CDV infection. **Semina: Ciências Agrárias**, v.33, n.6, p.2347-2358, 2012.

ANDREWS, F. M. Cerebrospinal fluid analysis and blood-brain barrier function. **Compendium on continuing education for the practicing veterinarian**, v.20, p.376-383, 1998.

APPEL, M. J.; SHEK, W. R.; SUMMERS, B. A. Lymphocyte-mediated immune cytotoxicity in dogs infected with virulent canine distemper virus. **Infection and Immunity**, v.37, n.2, p.592-600, 1982.

BACKSTROM, J.R.; LIM, G. O.; CULLEN, M. J.; TÖKÉS, Z.A. A. Matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) is synthesized in neurons of the human hippocampus and is capable of degrading the amyloid-beta peptide. **The Journal of Neuroscience**, v.16, n.24, p.7910–7919, 1996.

BEINEKE, A.; PUFF, C.; SEEHUSEN, F.; BAUMGÄRTNER, W. Pathogenesis and immunopathology of systemic and nervous canine distemper. **Veterinari Immunology and Immunopathology**, v.127, p.1-18, 2009.

BERGMAN, R. L.; INZANA, K. D.; INZANA, T. J. Characterization of matrix metalloproteinase-2 and -9 in cerebrospinal fluid of clinically normal dogs. **American Journal of Veterinary Research**, v.63, p.1359-1362, 2002.

BUDASZEWSKIA, R. F.; PINTOA, L. D.; WEBERA, M. N.; CALDARTB, E. T.; ALVESA, C. D. B. T.; MARTELLAC, V.; IKUTAD, N.; LUNGED, V. R.; CANAL, C. W. Genotyping of canine distemper virus strains circulating in Brazil from 2008 to 2012. **Virus Research**, v.180, p.76-83, 2014. Disponível em <doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.virusres.2013.12.024>>.

CANDELARIO-JALIL, E.; THOMPSON, J.; TAHERI, S.; GROSSETETE, M.; ADAIR, J. C. EDMONDS, E.; PRESTOPNIK, J.; WILLS, J.; ROSENBERG, G. A. Matrix Metalloproteinases Are Associated With Increased Blood–Brain Barrier Opening in Vascular Cognitive Impairment. **Stroke**, v.42, n.5, p.1245-1350, 2011.

CARDOSO, F.L.; BRITES, D.; BRITO, M. A. Looking at the blood-brain barrier: molecular anatomy and possible investigation approaches. **Brain Research Reviews**, v.64, n.2, p.328–63, 2010.

CARVALHO, O. V.; BOTELHO, C. V.; FERREIRA, C. G. T.; SCHERER, P. O.; SOARES-MARTINS, J. A. P.; ALMEIDA, M. R.; SILVA-JR, A. Immunopathogenic and Neurological Mechanisms of Canine Distemper Virus. **Advances in Virology**, v.2012, 2012. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1155/2012/163860>>.

CHANDLER, S.; COATES, R.; GEARING, A.; LURY, J.; WELLS, G.; BONE, E. Matrix metalloproteinases degrade myelin basic protein. **Neuroscience Letters**, v.201, n.3.; p.223-226, 1995.

CONANT, K.; MCARTHUR, J. C.; GRIFFIN, D. E.; SJULSON, L.; WAHL, L.M.; IRANI, D.N. Cerebrospinal fluid levels of MMP-2, 7, and 9 are elevated in association with human immunodeficiency virus dementia. **Annals of Neurology**, v.46, n.3, p.391–398, 1999.

COSSINS, J. A.; CLEMENTS, J. M.; FORD, J.; MILLER, K. M.; PIGOTT, R.; VOS, W.; VAN DER VALK, P.; DE GROOT, C. J. Enhanced expression of MMP-7 and MMP-9 in demyelinating multiple sclerosis lesions. **Acta Neuropathologica**, v.94, n.6, p.590-598, 1997.

CUZNER, M. L.; OPDENAKKER, G. Plasminogen activators and matrix metalloproteases, mediators of extracellular proteolysis in inflammatory demyelination of the central nervous system. **Journal of Neuroimmunology**, v.94, n.1-2, p.1-14, 1999.

DI TERLIZZI, R.; PLATT, S. The function, composition and analysis of cerebrospinal fluid in companion animals: Part II – Analysis. **The Veterinary Journal**, v.180, n.1, p.15-32, 2009. Disponível em: <doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tvjl.2007.11.024>>.

DUCOTÉ, J. M.; DEWEY, C. W. Diagnóstico das doenças do sistema nervoso. In: DEWEY, C. W. **Neurologia de cães e gatos**, São Paulo: Rocca, 2006, p.35-58.

FAINARDI, E.; CASTELLAZZI, M.; BELLINI, T.; MANFRINATO, M. C.; BALDI, E.; CASETTA, I.; PAOLINO, E.; GRANIERI, E.; DALLOCCHIO, F. Cerebrospinal fluid and serum levels and intrathecal production of active matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) as markers of disease activity in patients with multiple sclerosis. **Multiple Sclerosis Journal**, v.12, n.3, p.294-301, 2006.

FERNANDES, R.W. Determinação dos valores líquidos normais de glicose, proteína, globulina, uréia, creatina fosfoquinase (CK), aspartato aminotransferase (AST), leucócitos e da coloração, turbidez e coagulabilidade em cães saudáveis. **Brazilian Journal of Veterinary Research Animal Science**, v.27, n.02, p.209-216, 1990.

GAMA, F. G. V.; NISHIMORI, T. N.; SOBREIRA, M. R.; SANTANA, A. E. Caracteres físico-químicos e citológicos do líquido de cães em diferentes fases da cinomose. **Ciência Rural**, v.35, n.3, p.596-601, 2005.

GAMA, F. G. V.; NISHIMORI, C. T.; SOBREIRA, M. R.; SANTANA, A. E. Evaluation of electrophoretic profile and albumin quota in the cerebrospinal fluid of dogs with distemper showing or not nervous signs. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.59, n.1, p.77-80, 2007.

GEBARA, C. M. S.; WOSIACKI, S. R.; NEGRÃO, F. J.; OLIVEIRA, D.; BELONI, S. N. E.; ALFIERI, A. A.; ALFIERI, A. F.; Detecção do gene da nucleoproteína do vírus da cinomose canina por RT-PCR em urina de cães com sinais clínicos de cinomose. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.59, n.5, p.480-487, 2007.

GIJBELS, K., MASURE, S., CARTON, H., OPDENAKKER, G. Gelatinase in the cerebrospinal fluid of patients with multiple sclerosis and other inflammatory neurological disorders. **Journal of Neuroimmunology**, v.41, n.1, p.29-34, 1992.

GREENE, C. E.; APPEL, M. J. G. Canine distemper. In: Greene, C.E. (3th. Ed). **Infectious Diseases of the Dog and Cat**. W. B. Saunders, Philadelphia, 2006. Cap.3, p.25-40.

GRIOT, C.; VANDELVELDE, M.; SCHOBESBERGER, M.; ZURBRIGGEN, A. Canine distemper, a re-emerging Morbillivirus with complex neuropathogenic mechanisms. **Animal Health Research Reviews**, v.4, n.1, p.1-10, 2003.

HAIR, J. F.; ANDERSON, R. E.; TATHAM, R. L. & BLACK, W. **Análise multivariada de dados**. Porto Alegre, Bookman, 2005.

HARTUNG, H. P., KIESEIER, B. C. The role of matrix metalloproteinases in autoimmune damage to the central and peripheral nervous system. **Journal of Neuroimmunology**, v.107, n.2, p.140-147, 2000.

HEADLEY, S. A.; GRAÇA, D. L. Canine distemper: Epidemiological findings of 250 cases. **Brazilian Journal Of Veterinary Research And Animal Science**, v.37, n.2, p.52-58, 2000.

HIGGINS, R. J.; KRAKOWKA, S. G.; METZLER, A. E.; KOESTNER, A. Primary demyelination in experimental canine distemper virus induced encephalomyelitis in gnotobiotic dogs. **Acta Neurologica**, v.58, n.1, p.1-8, 1982.

JAIN, C.N. **Essentials of Veterinary Hematology**, Philadelphia: Lea & Febiger, p. 334-335, 1993.

KANEKO, J.J. **Clinical biochemistry of domestic animal**. 5.ed. San Diego: cademic, 2007. 932p.

KIM, I. H.; JUNG, D. I; YOO, J.H.; KANG, B. T.; PARK, C.; PAR, H.M. Cerebrospinal fluid analysis in 13 clinically healthy Beagle dogs: hematological, biochemical and electrophoretic findings. **Korean Journal of Veterinary Research**, v.48, n.1, p.105-110, 2008.

KLEINER, D. E.; STETLER-STEVENSON, W. G. Quantitative zymography: detection of picogram quantities of gelatinases. **Analytical Biochemistry**, v.218, n.2, p.325–329, 1994.

KOLB, S. A.; LAHRTZ, F.; PAUL, R.; LEPPERT, D.; NADAL, D.; PFISTER, H. W.; FONTANA, A. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in viral meningitis: upregulation of MMP-9 and TIMP-1 in cerebrospinal fluid. **Journal of Neuroimmunology**, v.84, n.2, p.143-150, 1998.

KOUTINAS, A. F.; BAUMGÄRTNER, TONTIS, D.; POLIZOPOULOU, Z.; SARIDOMICHELAKIS, M. N.; LEKKAS, S. Histopathology and Immunohistochemistry of Canine Distemper Virus-induced Footpad Hyperkeratosis (Hard Pad Disease) in Dogs with Natural Canine Distemper. **Veterinary Pathology**, v.41, n.1, p.2-9, 2004.

LEPPERT, D.; FORD, J.; STABLER, G.; GRYGAR, C.; LIENERT, C.; HUBER, S.; MILLER, K. M.; HAUSER, S. L.; KAPPOS, L. Matrix metalloproteinase-9 (gelatinase B) is selectively in CSF during relapses and stable phases of multiple sclerosis. **Brain**, v.121, p.2327-2334, 1998.

LEPPERT, D.; LEIB, S. L.; GRYGAR, C.; MILLER, K. M.; SCHAAD, U. B.; HOLLÄNDER, G. A. Matrix metalloproteinase (MMP)-8 and MMP-9 in cerebrospinal fluid during bacterial meningitis: association with blood-brain barrier damage and neurological sequele. **Clinical Infectious Diseases**, v.31, n.1, p.80-84, 2000.

LEPPERT, D.; WAUBANT, E.; GALARDY, R.; BUNNETT, N. W.; HAUSER, S. L. T Cell Gelatinases Mediate Basement Membrane Transmigration In Vitro. **Journal of Immunology**, v.154, n.9, p.4379-4389, 1995.

LEVINE, J. M.; RUAUX, C. G.; BERGMAN, R. L.; COATES, J. R.; STEINER, J. M.; WILLIAMS, D. A. matrix metalloproteinase-9 activity in the cerebrospinal fluid and serum of dogs with acute spinal cord trauma from intervertebral disk disease. **American Journal of Veterinary Research**, v.67, n.2, p.283-287, 2006.

LIM, G. P.; BACKSTROM, J. R.; CULLEN, M. J.; MILLER, C. A.; ATKINSON, R. D.; TÖKÉS, Z. A. Matrix metalloproteinases in the neocortex and spinal cord of amyotrophic lateral sclerosis patients. **Journal of Neurochemistry**, v.67, n.1, p.251–259, 1996.

LUKASZEWICZ-ZAJAC, M.; MROCZKO, B.; KORNHUBER, J.; LEWCZUK, P. Matrix metalloproteinases (MMPs) and their tissue inhibitors (TIMPs) in the tumor of central nervous system (CNS). **Journal of Neurotransmission**, 2013. Disponível em <<http://dx.doi.org/10.1007/s00702-013-1143-5>>.

LUKES, A.; MUN-BRYCE, S.; LUKES, M.; ROSENBERG, G. A. Extracellular matrix degradation by metalloproteinases and central nervous system disease. **Molecular Neurobiology**, v.19, n.3, p.267-284, 1999.

MACHADO, G. F.; MELO, G. D.; SOUZA, M. S.; MACHADO, A. A.; MIGLIOLO, D. S.; MORAES, O. C.; NUNES, C. M.; RIBEIRO, E. S. Zymographic patterns of MMP-2 and MMP-9 in the CSF and cerebellum of dogs with subacute distemper leukoencephalitis. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.154, n.1-2, p.68-74, 2013.

MARANGONI, N. R.; MELO, G. D.; MORAES, O. C.; SOUZA, M. S.; PERRI, S. H.; MACHADO, G. F. Levels of matrix metalloproteinase-2 and metalloproteinase-9 in the cerebrospinal fluid of dogs with visceral leishmaniasis. **Parasite Immunology**, v.33, n.6, p.330–334, 2011.

MCCAWLEY, L. J.; MATRISIAN, L. M. Matrix metalloproteinases: they're not just for matrix anymore! **Current Opinion in Cell Biology**, v.13, n.5, p.534-540, 2001.

MELO, G. D.; MARANGONI, N. R.; MARCONDES, M.; LIMA, V. M.; MACHADO, G. F. High levels of serum matrix metalloproteinases in dogs with natural visceral leishmaniasis: A preliminary report. **The Veterinary Journal**, v.188, n.2, p.243–245, 2011.

MIAO, Q.; BAUMGÄRTNER, W.; FAILING, K.; ALLDINGER, S. Phase-dependent expression of matrix metalloproteinases and their inhibitors in demyelinating canine distemper encephalitis. **Acta Neuropathologica**, v.106, n.5, p.486-494, 2003.

MUN-BRYCE, S.; ROSENBERG, G. A. Gelatinase B modulates selective opening of the blood-brain barrier during inflammation. **The American Journal of physiology**, v.274, n.5, p.R1203-R2011, 1998.

NEGRÃO, F. J.; ALFIERI, A. A.; ALFIERI, A. F. Avaliação da urina e de leucócitos como amostras biológicas para a detecção ante mortem do vírus da cinomose canina por RT-PCR em cães naturalmente infectados. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.59, n.1, p.253–257, 2007.

OKITA, M.; YANAI, T.; OCHIKUBO, F.; GEMMA, T.; MORI, T.; MASEKI, T.; YAMANOUCI, K.; MIKAMI, T.; KAI, C. Histopathological features of canine distemper recently observed in Japan. **Journal of Comparative Pathology**, v.116, n.4, p.403-408, 1997.

PAUL, R.; LORENZL, S.; KOEDEL, U.; SPORER, B.; VOGEL, U.; FROSCHE, M.; PFISTER, H. W. Matrix metalloproteinases contribute to the blood-brain barrier disruption during bacterial meningitis. **Annals of Neurology**, v.44, n.4, p.592-600, 1998.

PERIDES, G.; CHARNESS, M. E.; TANNER, L. M.; PÉTER, O.; SATZ, N.; STEERE, A. C.; KLEMPNER, M. S. Matrix metalloproteinases in the cerebrospinal fluid of patients with Lyme neuroborreliosis. **The Journal of Infectious Disease**, v.177, n.2, p.401-408, 1998.

RANSOHOFF, R. M.; PERRY, V. H. Microglial physiology: unique stimuli, specialized responses. **Annual Review Immunology**, v.27, p.119-45, 2009.

ROE, K.; KUMAR, M.; LUM, S.; ORILLO, B. NERURKAR, V. R.; VERMA, S. West Nile virus-induced disruption of the blood-brain barrier in mice is characterized by the degradation of the junctional complex proteins and increase in multiple matrix metalloproteinases. **Journal of General Virology**, v.93, p.1193-1203, 2012.

ROSENBERG G. A. Matrix metalloproteinases in brain injury. **Journal of Neurotrauma**, v.12, n.5, p.833-842, 1995.

ROSENBERG, G. A. Matrix Metalloproteinases and Neuroinflammation in Multiple Sclerosis. **The Neuroscientist**, v.8, n.6, p.586-595, 2002.

ROSENBERG, G. A. Matrix metalloproteinases in neuroinflammation. **Glia**, v.39, n.3, p.279-291, 2002.

ROSENBERG, G. A. Neurological diseases in relation to the blood-brain barrier. **Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism**, p.1-13, 2012.

ROSENBERG, G. A.; KORNFELD, M.; ESTRADA, E.; KELLEY, R. O.; LIOTTA, L. A.; STETLER-STEVENSON, W. G. TIMP-2 reduces proteolytic opening of blood-brain barrier by type IV collagenase. **Brain Research**, v.576, n.2, p.203-207, 1992.

SCHWARTZ, M.; PUFF, C.; STEIN, V. M.; BAUMGARTNER, W.; TIPOLD, A. Marked MMP-2 transcriptional up-regulation in mononuclear leukocytes invading the subarachnoidal space in aseptic suppurative Steroid-Responsive Meningitis-Arteritis in dogs. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.133, n.2-4, p.198-206, 2010.

SEKIUCHI, M.; KUDO, A.; NAKABAYASHI, K.; KANAI-AZUMA, M.; AKIMOTO, Y.; KAWAKAMI, H.; YAMADA, A. Expression of matrix metalloproteinases 2 and 9 and tissue inhibitors of matrix metalloproteinases 2 and 1 in the glomeruli of human glomerular diseases: the results of studies using immunofluorescence, in situ hybridization, and immunoelectron microscopy. **Clinical and Experimental Nephrology**, v.16, n.6, p.863-874, 2012.

SEMOLIN, L. M. S. **Expressão das metaloproteínas de matriz 2 e 9 em cães com linfoma: associação com fatores prognóstico.** 2013. 70f. Dissertação (Mestrado em Cirurgia Veterinária) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Jaboticabal, 2013.

SLOAN, C. D. K.; NANDI, P.; LINZ, T. H.; ALDRICH, J. V.; AUDUS, K. L.; LUNTE, S. M. Analytical and Biological Methods for Probing the Blood-Brain Barrier. **Annual Review of Analytical Chemistry**, v.5, p.505-531, 2012.

SULIK, A.; WOJTKOWSKA, M.; OLDAK, E. Preanalytical factors affecting the stability of matrix metalloproteinase-2 concentrations in cerebrospinal fluid. **Clinica Chimica Acta**, v.392, n.1-2, p.73-75, 2008.

Tan, R. J.; Liu, Y. Matrix metalloproteinases in kidney homeostasis and diseases. **American Journal of Physiology. Renal Physiology**, v.302, n.11, p.F1351-F1361, 2012. Disponível em <<http://dx.doi.org/10.1152/ajprenal.00037.2012>>.

TIPOLD, A., PFISTER, H., ZURBRIGGEN, A., VANDEVELDE, M. Intrathecal synthesis of major immunoglobulin classes in inflammatory diseases of the canine CNS. **Veterinary Immunology and Immunopathology** v.42, n.2, p.149–159, 1994.

TUDURY, E.A.; ARIAS, M. V. B.; BRACARENSE, A. P. F. L.; MEGID, J.; JÚNIOR, R. F. D. Observações clínicas e laboratoriais em cães com cinomose nervosa. **Ciência Rural, Santa Maria**, v.27, n.2, p.229-235, 1997.

TURBA, M. E.; FOMI, M.; GANDINI, G.; GENTILINI, F. Recruited leukocytes and local synthesis account for increased matrix metalloproteinase-9 activity in cerebrospinal fluid of dogs with central nervous system neoplasm. **Journal of neuro-oncology**, v.81, n.2, p.123-129, 2007.

VANDEVELDE, M.; ZURBRIGGEN, A. Demyelination in canine distemper virus infection: a review. **Acta Neuropathologica**, v.109, n.1, p.56–68., 2005.

VANDEVELDE, M.; ZURBRIGGEN, A. The neurobiology of canine distemper virus infection. **Veterinary Microbiology**, v.44, n2–4, p. 271–280, 1995.

WANG, P.; DAI, J.; BAI, F.; KONG, K.; WONG, S. J.; MONTGOMERY, R. R.; MADRI, J. A.; FIKRIG, E. Matrix metalloproteinase 9 facilitates west nile virus entry into the brain. **Journal of Virology**, v. 82, n.18, p.8978-8985, 2008.

WÜNSCHMANN, A.; ALLDINGER, S.; KREMMER, E.; BAUMGÄRTNER, W. Identification of CD4+ and CD8+ T cell subsets and B cells in the brain of dogs with spontaneous acute, subacute and chronic-demyelinating distemper encephalitis. **Veterinary Immunology and Immunopathology** v.67, n.2, p.101–116. 1999.

WYSS-FLUEHMANN, G.; ZURBRIGGEN, A.; VANDEVELDE, M.; PLATTET, P. Canine distemper virus persistence in demyelinating encephalitis by swift

intracellular cell-to-cell spread in astrocytes is controlled by viral attachment protein. **Acta Neuropathologica**, V.119, n.5, p.617-630, 2010.

YONG, V. W.; POWER, C.; FORSYTH, P.; EDWARDS, D. R. Metalloproteinases in biology and pathology of the nervous system. **Nature Reviews. Neuroscience**, v.2, n.7, p.502-511, 2001.

USCENO, M.; EEB, F.; ME, M.; SCULL, U.; MALISZEWSKA, M.; TUMANI, H.; FELGENHAUER, K.; BEUCHE, W. Matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) in human cerebrospinal fluid (CSF): elevated levels are primarily related to CSF cell count. **Journal of Neuroimmunology**, v.110, n.1-2, p.244-251, 2000.

ZAKIYANOV, O.; KALOUSOVÁ, M.; KRATOCHVILOVÁ, M.; KRÍHA, V.; ZIMA, T.; TESAR, V. Changes in levels of matrix metalloproteinase-2 and -9, pregnancy-associated plasma protein-A in patients with various nephropathies. **Journal of Nephrology**, v.26, n.3, p.502-509, 2013.

## APÊNDICES

Apêndice A. Reações em cadeia da polimerase (PCR) e sorologias de cães triados, porém não inclusos na parcela experimental do grupo controle (Gcon).

Animal	Cinomose <sup>1</sup>	<i>Ehrlichia canis</i> <sup>1</sup>	<i>Babesia canis</i> <sup>2</sup>	<i>Toxoplasma gondii</i> <sup>3</sup>	<i>Neospora caninum</i> <sup>3</sup>	<i>Leptospira</i> sp. <sup>4</sup>
Cão 1	N	P	N	1:1280*	1:25*	N
Cão 2	N	N	N	1:320*	1:25*	<i>L. canicola</i> 1:200*
Cão 3	N	N	N	1:320*	N	<i>L. australis</i> 1:400*
Cão 4	N	N	P	1:160*	N	N
Cão 5	N	P	N	N	N	N
Cão 6	N	N	P	1:80*	N	<i>L. australis</i> 1:100* <i>L. autumnalis</i> 1:100*

<sup>1</sup>Real Time PCR; <sup>2</sup>Semi Nested PCR; <sup>3</sup>RIFI=Reação de Imunofluorescência Indireta; <sup>4</sup>SAM=Reação de Soroaglutinação Microscópica; \*Titulação.  
N=Negativo; P=Positivo.

Apêndice B. Características e alterações neurológicas apresentadas pela parcela experimental do grupo Gcin. Jaboticabal, 2014.

Animal	Raça	Idade	Sexo	Alteração neurológica
A1	Chow chow	6 meses	Fêmea	Ataxia propioceptiva em 4 membros; paraparesia ambulatória; ausência de propriocepção em 4 membros; mioclonia
A2	SRD*	1 ano	Macho	Mioclonia
A3	Teckel	4 anos	Fêmea	Ataxia propioceptiva em 4 membros; déficit propioceptivo em 4 membros; mioclonia
A4	SRD*	4 meses	Fêmea	Obnubilado; paraparesia não ambulatória; ausência de reflexo oculocefálico; ausência de sensibilidade nasal bilateral; ausência de propriocepção em 4 membros; mioclonia
A5	SRD*	1 ano	Fêmea	Decúbito; opstótono; ausência de reflexo oculocefálico; ausência de sensibilidade nasal bilateral; ausência de propriocepção em 4 membros; tetraplegia flácida; mioclonia
A6	SRD*	6 meses	Fêmea	Ataxia propioceptiva em 4 membros; déficit reflexo oculocefálico; ausência de propriocepção em 4 membros; mioclonia
A7	SRD*	2 anos	Macho	Paraparesia não ambulatória; dismetria, déficit reflexo oculocefálico; nistagmo horizontal; ausência de propriocepção em 4 membros; mioclonia
A8	SRD*	1 ano	Fêmea	Decúbito; opstótono; paraplegia espástica; nistagmo horizontal; ausência de reflexo oculocefálico; ausência de sensibilidade nasal; mioclonia
A9	Labrador	3 anos	Macho	Ataxia propioceptiva em membros pélvicos; paraparesia ambulatória; déficit propioceptivo em membros pélvicos
A10	SRD*	1 ano	Macho	Vocalização; agressividade; dismetria, tetraparesia não ambulatória; nistagmo horizontal; ausência de reflexo oculocefálico; ausência de sensibilidade nasal; ausência de propriocepção em 4 membros

\*SRD=Sem raça definida

Apêndice C. Reações em cadeia da polimerase (PCR) e sorologias de cães triados, porém não inclusos na parcela experimental do grupo cinomose (Gcin).

Animal	Cinomose <sup>1</sup>	<i>Erlichia canis</i> <sup>1</sup>	<i>Babesi a canis</i> <sup>2</sup>	<i>Toxoplasma gondii</i> <sup>1</sup>	<i>Neospora caninum</i> <sup>3</sup>	<i>Leptospira sp.</i> <sup>4</sup>
Cão 1	N	N	N	N	N	N
Cão 2	N	N	N	N	N	N
Cão 3	N	N	N	N	N	N
Cão 4	N	N	N	N	N	N
Cão 5	N	P	N	1:320*	1:100*	N
Cão 6	N	P	N	N	N	N
Cão 7	P	P	N	N	N	N
Cão 8	P	N	P	N	N	N
Cão 9	P	P	N	N	N	N
Cão 10	P	P	N	N	N	N
Cão 11	P	N	N	1:320*	N	N
Cão 12	P	N	P	N	N	N
Cão 13	P	P	P	N	N	N
Cão 14	P	N	N	1:80*	1:25*	N
Cão 15	P	P	P	N	N	<i>L. autummalis</i> 1:100*
Cão 16	P	P	N	1:320*	1:100*	N
Cão 17	P	N	N	N	N	<i>L. icterohaemorrhagiae</i> 1:200* <i>L. pomona</i> 1:100* <i>L. copenhageni</i> 1:100* <i>L. grippotyphosa</i> 1:100* <i>L. autummalis</i> 1:100* <i>L. australis</i> 1:100*

<sup>1</sup>Real Time PCR; <sup>2</sup>Semi Nested PCR; <sup>3</sup>RIFI=Reação de Imunofluorescência Indireta; <sup>4</sup>SAM=Reação de Soroglutinação Microscópica; \*Titulação.  
N=Negativo; P=Positivo.

Apêndice D. Valores de referência da contagem celular, proteína total líquórica, glicorraquia e cota de albumina em cães.

	GAMA et al., 2005	KIM et al. 2008	DI TERLIZZI; PLATT, 2009
Contagem células nucleadas (células/ $\mu$ L)	0 - 5	0 - 5	0 - 5
Proteína total (mg/dL)	< 30	<30	<30
Cota de albumina	-	<2,35	<2,35
Glicorraquia (mg/dL)	61 - 116	53 - 104	60 – 80% da taxa glicêmica