

## RESSALVA

Alertamos para ausência das páginas pré-textuais, não incluídas pela autora no arquivo original.

## **1. INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA**

Disfunções envolvendo o sistema nervoso são de grande importância na Medicina Veterinária, pois tratam-se de enfermidades que ocorrem com frequência e que cujas ferramentas para o auxílio diagnóstico, prognóstico e procedimentos terapêuticos, apresentam-se muito escassas. Desta forma, a análise dos constituintes do fluido cefalorraquidiano revela-se como uma das poucas alternativas de acesso clínico ao sistema nervoso central (SNC) (BAILEY ; VERNAU, 1997). Mesmo assim, avaliar danos no SNC pode se tornar um desafio, visto que logo após uma injúria encefálica, exames como tomografias computadorizadas e ressonâncias magnéticas não permitem a distinção entre o edema cerebral e uma lesão estrutural e, ainda, a informação de alguns aspectos do exame de rotina do LCE, não é suficiente para indicar o verdadeiro estado neurológico de um paciente, em diversas situações (GAMA et al. 2005). Recentemente, a avaliação de marcadores bioquímicos no líquido cefalorraquidiano tem sido utilizada como auxílio na detecção de danos estruturais do tecido nervoso, bem como no dimensionamento de sua extensão. Além disso, tais marcadores têm se tornado de grande valia no ajuizamento do prognóstico dos pacientes portadores de lesões neurológicas de inúmeras causas (YUKIO et al. 2001).

## 1.1 Características Gerais do LCE

Segundo Kay et al. (1974), o líquido cefalorraquidiano (LCR) ou LCE é um fluido claro e límpido, o qual banha os sistemas ventricular e extra-ventricular, cérebro, medula espinhal e certas partes do sistema nervoso periférico. Sua produção ocorre, primariamente, pelo plexo coróide do sistema ventricular, pequenas quantidades são produzidas por células endoteliais da pia-glia na superfície cerebral e, ainda, por vasos sanguíneos da pia-aracnóide, utilizando-se de mecanismo de ultrafiltração do plasma, juntamente com transporte ativo de substâncias através da barreira hemato-encefálica (WRIGHT, 1978; COLES, 1986; MCGUIRK ; MACWILLIAMS, 1992 e BRAUND, 1994; BAILEY ; VERNAU, 1997).

Os autores Coles (1986), Cook e Denicola (1988) e Bailey ; Vernau (1997) relatam que o LCE circula do sistema ventricular para o espaço sub-aracnóide, pelas aberturas laterais do quarto ventrículo, e segue em direção às membranas da pia-máter e aracnóides do cérebro e medula espinhal, banhando assim, toda a área do SNC.

O LCR é absorvido, constantemente, pelas vilosidades aracnóideas, nos seios venosos e veias cerebrais e em pequenas quantidades por veias e vasos linfáticos localizados próximos às raízes de nervos periféricos, cujo mecanismo é controlado por válvulas, as quais se abrem quando a pressão intracraniana excede a venosa (em condições normais) e se fecham quando a pressão venosa aumenta, prevenindo, desta maneira, a possibilidade de fluxo retrógrado do sangue venoso em direção ao espaço sub-aracnóideo (COOK ; DENICOLA,1988).

De acordo com Mayhew e Beal (1980) as funções do LCR incluem a de proteção das estruturas cerebrais, agindo como um “amortecedor”, que absorve pressões externas, além de trazer nutrientes para o SNC e, adicionalmente, remover produtos residuais inúteis e levar agentes injuriantes ao encontro dos mecanismos de defesa do organismo.

Segundo Sorjonem (1987) e Bailey ; Vernau (1997) o cérebro se mantém isolado do resto do corpo, pois muitas moléculas que circulam no sangue não alcançam o LCR e vice-versa. Adicionalmente, Sorjonem (1987) relata que a seletividade entre eles ocorre pela ação da barreira hemato-encefálica (BHE), uma entidade físico-química que

confere estabilidade ao cérebro frente às variações drásticas e momentâneas da circulação geral e, ao mesmo tempo, impondo um problema para o tratamento de certas enfermidades.

Estudos experimentais atestam que a análise do líquido cefalorraquidiano é vista pelos clínicos como um acesso ao encéfalo e é capaz de refletir mudanças fisiopatológicas da sua função, Chrisman (1985), Braund (1994) e Bailey ; Vernau (1997). Wright (1978) ressalta ser possível aplicar ao LCR alguns dos inúmeros testes aplicados ao sangue, e a outros fluidos biológicos, conseguindo-se informações importantes e de grande valor diagnóstico.

## **1.2 Análise do LCE**

### **1.2.1 Aspectos Físico-Químicos do LCE**

Chrisman (1985) e Coles (1986) relatam que o líquido cefalorraquidiano normal é claro e incolor, porém em condições patológicas pode apresentar-se amarelado ou xantocrômico, indicando presença de bilirrubina, proveniente de possíveis hemorragias antigas, ou rosado a avermelhado indicando hemorragias acidentais no momento da colheita. Já, quanto ao aspecto, o LCE normal é completamente transparente e Wright (1978), Coles (1986), Braund (1994) e Bailey ; Vernau (1997) relatam que o LCE turvo está relacionado com o aumento da sua celularidade, particularmente quando o referido aumento ultrapassa a 500 células/ $\mu$ L de LCE. Por outro lado, em infecções agudas das meninges, o LCR pode ficar ligeiramente turvo a purulento e Wright (1978) e Delahunta (1983) ressaltam que, nestes casos, exames microbiológicos são indicados. Feitosa et al. (1997a) encontrou turbidez discreta em amostras de LCE de cães portadores de cinomose e relacionou-a ao aumento de proteína total no referido LCR.

A densidade liquórica tem valores normais compreendidos entre 1,003 e 1,012 (KAY et al. 1974). Mayhew ; Beal (1980) asseveram que a elevação do peso específico do LCR pode ocorrer nos casos de pleocitose e aumento dos seus níveis protéicos, também referidos por Feitosa et al. (1997).

Bailey ; Vernau (1997) relatam que em estudos laboratoriais envolvendo animais verificaram-se a presença de mecanismos homeostáticos a favor da manutenção de um pH liquórico relativamente constante e próximo daquele do sangue, mesmo frente a mudanças de pH sistêmico. Neste último caso, a barreira hemato-encefálica tem grande participação na manutenção do pH liquórico visto que, é relativamente impermeável aos íons hidrogênio e bicarbonato. Porém, os mesmos autores relatam que alterações do pH do LCE podem seguir as do sangue, em situações agudas e mais drásticas como acidose e alcalose metabólicas.

### **1.2.2 Proteínas no LCE**

Segundo Coles (1986) o LCE normal, proveniente da cisterna magna, contém aproximadamente 12 a 40 mg/dL de proteína, já Fernandes (1990) encontrou valor médio de 20 mg/dL e Braund (1994) considera normais quantidades entre 25 a 30 mg/dL. Os referidos autores relatam que o componente protéico do LCR é quase que totalmente constituído de albumina, sendo que pequenas quantidades de globulinas podem ser encontradas. No entanto, em situações de quebra do estado de higidez do SNC os níveis protéicos podem estar aumentados, principalmente nos casos de encefalites, como foi constatado por Tudury et al. (1997) em cães com cinomose cujos, valores encontrados alcançaram 400 mg/dL. Além disso, em casos de toxoplasmose, meningite, abscessos de medula ou encéfalo e, também, em condições não-inflamatórias caracterizadas por estados convulsivos e uremia, verificam-se aumentos da proteína liquórica. Delahunta (1983), Braund (1994) e Bailey ; Vernau (1997) citam que estes aumentos podem ocorrer por produção protéica local junto ao SNC, porém os aumentos concomitantes nos níveis de albumina do LCE e da relação entre a albumina liquórica e sérica sugerem lesão da barreira hemato-encefálica e extravasamento de albumina, fato observado por Gama (2003) em cães na fase neurológica da cinomose. Em relação às dosagens protéicas do LCE, alguns cuidados devem ser tomados como indica Coles (1986), que alerta para amostras contaminadas com sangue, cujo nível protéico fica superestimado pela presença de proteínas plasmáticas e, principalmente, que neste caso a determinação de globulinas não deve

ser realizada, para se evitar um resultado falso positivo. Em tais situações, é possível, ainda, observar-se a coagulação do LCE, fato também verificado nas infecções supurativas. Já, Hurtt ; Smith (1997) observaram que o nível protéico de amostras de LCR, levemente contaminadas com sangue, não compromete o diagnóstico de doença neurológica. Além disso, Bailey ; Higgins (1985) e Hurtt ; Smith (1997) verificaram que os níveis protéicos das amostras coletadas da região lombar são significativamente mais altos que daquelas obtidas por punção da cisterna magna.

Apesar da gama de parâmetros que podem ser analisados no LCR, no intuito de se angariar o maior número de informações possíveis com relação ao estado neurológico atual do paciente, alguns aspectos apreciados no exame liquórico de rotina nem sempre colocam em evidência suas anormalidades neurológicas. Tal fato acontece no caso de algumas enfermidades de evolução muito aguda, como viroses, as quais podem elicitam alterações mais sutis e de difícil detecção. Gama et al. (2005), estudando cães com cinomose, verificaram que a coloração, o aspecto, a taxa de glicose e, em parte, a celularidade, avaliados ao exame liquórico de rotina, mostraram-se semelhantes ou bem próximos àqueles dos animais hígidos.

Desta forma, a avaliação de algumas características liquóricas mais sensíveis, que possam revelar anormalidades precoces e com maior precisão, se faz necessária a fim de se investigar alterações no sistema nervoso central. Para tal propósito, alguns marcadores bioquímicos, analisados no LCR, podem ser bastante úteis tais como as atividades liquóricas de algumas enzimas, geralmente liberadas no LCR, na vigência de lesões estruturais neurológicas (KRAMER ; HOFFMANN, 1997; INGEBRIGTSEN ; ROMNER, 2002).

### **1.3 Análise Enzimática do LCE**

O estudo de algumas enzimas, cujas atividades estão presentes nos fluidos orgânicos, em decorrência de processos patológicos, tem servido para indicar a presença de doença ou, em alguns casos, para adicionar elementos indicadores do

curso clínico-patológico da doença. Avaliações séricas das atividades de enzimas tais como creatina quinase (CK), lactato desidrogenase (LDH) e aspartato aminotransferase (AST) têm demonstrado seu valor diagnóstico em infartos do miocárdio, distrofias musculares e polimiosites (CARDINET, 1997). Elevações líquóricas das supracitadas enzimas têm sido observadas em inúmeras desordens neurológicas, tais como infartos, traumas ou ainda infecções do SNC, de acordo com Osuna et al. (1992), Yukio et al. (2001) e Gama (2003). Segundo Mayhew ; Beal (1980), as referidas enzimas são moléculas de natureza protéica, relativamente grandes, que não transpassam livremente a barreira hemato-encefálica e, deste modo, atividades elevadas de tais enzimas no LCE, podem indicar lesões e até necrose do tecido nervoso central e, especialmente, se tais elevações das atividades enzimáticas catalíticas não ocorrem simultaneamente no soro sanguíneo.

### **1.3.1 Lactato Desidrogenase**

A enzima lactato desidrogenase cataliza a oxidação de piruvato em lactato, a qual é dividida em cinco isoenzimas, denominadas LDH 1 a 5 (KRAMER ; HOFFMAN, 1997). As diferentes isoenzimas da LDH estão localizadas no citoplasma das células de vários órgãos e, desta forma, as isoenzimas 1 a 3 localizam-se no músculo cardíaco, rins, hemácias e tecido nervoso, enquanto que as isoenzimas 4 e 5 localizam-se predominantemente na musculatura esquelética e fígado (INGEBRIGTSEN ; ROMNER, 2002).

Injúrias em vários órgãos promovem a liberação de LDH para o espaço extracelular e sangue circulante, tornando a sua mensuração sérica inespecífica para a detecção de lesões teciduais, mesmo no que diz respeito às injúrias na musculatura cardíaca e esquelética. A especificidade seria possível pela mensuração da atividade de cada isoenzima, porém este procedimento é dispendioso e pouco realizado em medicina veterinária (LASSEN, 2004).

Em amostras líquóricas, a atividade aumentada da LDH tem origem nervosa e nos casos de doenças infecciosas é quase sempre liberada, apresentando mensurações elevadas de suas atividades catalíticas em casos humanos de meningites

bacterianas, segundo Lutsar et al. (1994); Nussinovitch (1996) e, também em cães acometidos pela cinomose, segundo Wright (1980); Feitosa et al. (1997b); Abate et al. (1998) ; Gama (2003).

Já no que diz respeito ao prognóstico, Gama (2003) faz referência à correspondência entre elevações da atividade de LDH líquórica e o índice de óbito em cães com cinomose, fato também observado por Osuna et al. (1992) e Lutsar et al. (1994), em humanos com danos cerebrais.

### **1.3.2 Aspartato Aminotransferase**

A enzima aspartato aminotransferase cataliza a transaminação do L-aspartato e 2-oxoglutarato em oxaloacetato e glutamato. A presença de AST, no citossol de células de vários tecidos orgânicos, torna esta enzima pouco específica, porém muito sensível a danos teciduais (KRAMER; HOFFMANN, 1997). As maiores concentrações desta enzima estão localizadas nos hepatócitos, da mesma forma que na musculatura esquelética e cardíaca. Conseqüentemente, suas elevações séricas podem ocorrer frente a injúrias nestes diferentes tecidos (LASSEN, 2004).

A enzima AST é tida como indicadora de necrose ativa no SNC, quando mensurada no LCE, por autores como Chrisman (1985); Bailey ; Vernau (1997), em cães, e por Osuna et al. (1992); Lutsar et al. (1994), em humanos. Sendo assim, Wright (1980) e Abate et al. (1998) constataram elevações líquóricas da atividade de AST em diversas desordens neurológicas dos cães tais como doenças de disco intervertebral, neoplasias, mielopatias degenerativas e toxoplasmose, enquanto que Feitosa et al. (1997b); Gama (2003), especificamente relacionaram tais elevações à ocorrência da cinomose.

Segundo Lutsar et al. (1994); Bailey; Vernau (1997) aumentos consideráveis da atividade enzimática de AST no LCE podem indicar prognóstico pobre, fato também observado por Gama (2003), em animais acometidos pela cinomose.

### **1.3.4 Creatina Quinase**

A creatina quinase é a enzima responsável pela catalisação da reação reversível fosfocreatina + ADP  $\leftrightarrow$  creatina + ATP. Ela está presente em maiores concentrações na musculatura esquelética e cardíaca. Porém quantidades consideráveis desta enzima são encontradas no SNC. Acredita-se que a CK seja o principal agente envolvido no suprimento de adenosina trifosfato para manter o potencial de membrana dos neurônios (CARDINET, 1997). E de acordo com Kramer; Hoffmann (1997), o cérebro tem a maior especificidade de CK do organismo.

Como relatado por Hornemann et al. (2000), a CK é um dímero, composto da combinação de duas subunidades denominadas B e M, deste modo, a creatina quinase total está dividida em três isoenzimas BB, MB e MM. A isoenzima CK MB está presente na musculatura cardíaca, a CK-MM na esquelética e a CK BB encontra-se principalmente no tecido nervoso (KRAMER ; HOFFMANN, 1997).

A avaliação da atividade total da enzima creatina quinase no LCE tem sido relatada como indicadora de desordens neurológicas por diversos autores, dentre os quais, Wolintz et al. (1969); Wright (1980); Chrisman (1985); Cook e Denicola (1988); Bailey; Vernau (1997). Mayhew e Beal (1980) indicam que atividades elevadas de tal enzima no LCE podem indicar lesões e até necrose do tecido nervoso central. Experimentos realizados em felinos por Maas (1977a,b) demonstram que a atividade da CK líquórica reflete lesões estruturais do cérebro, principalmente em injúrias agudas e, ainda, que a magnitude destes aumentos é proporcional à extensão tais lesões neurológicas.

Abate et al. (1998) observaram elevações de CK líquórica frente à cinomose canina e outros autores tais como Indrieri et al. (1980); Bailey ; Vernau (1997); Gama (2003) revelam ainda que, aumentos da atividade desta enzima também podem estar relacionados com prognósticos desfavoráveis em diversas enfermidades neurológicas como também na supracitada virose, fato este não confirmado por Feitosa et al. (1997b), frente à mesma moléstia. Além disso, trabalhos realizados por Lutsar et al. (1994), em humanos com meningite séptica ou asséptica indicam que a avaliação da isoenzima CK-BB, no LCE, pode redundar em resultados bem mais promissores e fiéis

às lesões neurológicas, como também no prognóstico dos quadros neuropatológicos, comparativamente à avaliação da atividade da CK total, no LCE.

### **1.3.5 Creatina Quinase BB**

Estudos precedentes sugerem que a distribuição das isoenzimas da CK no LCE é similar à sua distribuição no tecido nervoso, sendo representadas principalmente por CK-BB e pequenas quantidades de CK-MM e CK-MB (KJELDSBERG; KNIGHT, 1992). Porém, estudos de Chandler et al. (1984) e Vásquez et al. (1995) mostraram que a CK-BB é a isoenzima da CK mais largamente distribuída no cérebro, localizada em neurônios e astrócitos e representa de 80 a 95% da atividade total de CK do tecido nervoso sendo que, o restante é representado por CK mitocondrial. Os mesmos autores explicam que o componente de CK-MM, possivelmente encontrado, se deve à contaminação da amostra líquórica com sangue, de outra parte, que a CK-MB, provém da recombinação da CK-MM com a CK-BB liberada no LCE pelo dano encefálico.

Yukio et al. (2001) indicam que a correlação da CK-BB no LCR, com a de outras enzimas, independe das concentrações séricas e ainda das quantidades protéicas do LCR. Trabalhos anteriores como os de Sherwin et al. (1969); Mass (1977a) confirmaram este fato e, deste modo, fazem referência a baixa permeabilidade da barreira hemato-encefálica para estas substâncias. Bakay; Ward (1983) comprovaram a liberação de CK-BB decorrente de destruição de tecidos cerebrais. Desta forma, Ingebrigtsen; Romner (2002) descrevem que a avaliação sérica da atividade da isoenzima CK-BB não apresenta sensibilidade ou especificidade adequada para ser utilizada como indicador de dano neurológico. E Kramer; Hoffmann, (1997) reafirmam tal fato indicando que as elevações das atividades séricas de CK, em desordens neurológicas, não resultam do escape desta enzima do sistema nervoso para a circulação sanguínea, mas sim é o resultado de isquemia muscular, convulsões e imobilidade prolongada, que acompanham moléstias nervosas.

Kjedeldsberg; Knight (1992) relatam que, frente a situações cerebrais anóxicas ou hipóxicas, em cães, a CK-BB começa a ser liberada com 6 horas e tem seu pico de liberação em 48 horas após o início da injúria. Inúmeros trabalhos têm sido conduzidos

com o intuito de se verificar a validade da atividade da isoenzima CK-BB no LCR nas diversas injúrias neurológicas em humanos. Deste modo, Hans et al. (1983); Vázquez et al. (1995); Hans et al. (1989); Osuna et al. (1992); Kärkelä et al. (1993); Tirschwell et al. (1997); Yukio et al. (2001) estudaram a CK-BB no LCE de pessoas que sofreram parada cardíaca a fim de avaliar os danos no sistema nervoso central, após a sua hipóxia, e, ainda, nos casos de traumas cerebrais severos, e mostraram que a atividade da CK-BB líquórica possibilita ajuizar o prognóstico do quadro neuropatológico, e condiz com a escala de coma utilizada para avaliá-los, quanto à possibilidade de recuperação do paciente. Kjedeldsberg; Knight (1992) indicam que em pacientes cujos valores de CK-BB líquórica se encontram acima de 50U/L, geralmente, tais pacientes vêm a óbito logo após lesões cerebrais ocasionadas por paradas cárdio-respiratórias. Bödvarsson et al. (1990) ressaltam que a investigação desta isoenzima, nos primeiros dias após o início da lesão neurológica, é imprescindível para o sucesso da interpretação dos resultados. Adicionalmente, Nussinovitch et al. (1996) indicam o estudo da CK-BB líquórica como eficiente reflexo de lesões em situações de meningite e, ainda, reportam a eficiência de tal estudo para a distinção entre a meningite asséptica e séptica, cujos resultados mostraram elevações significativas das atividades da enzima, relacionados com a meningite séptica. Estudos realizados por Guiu et al. (1986) mostraram resultados importantes no que diz respeito a elevações de CK-BB líquórica em casos de tumores intracranianos, não só em tumores primários, mas também em metástases cerebrais e indicam que, nestes casos, a liberação enzimática ocorre por dois mecanismos, a destruição tecidual e compressão de tecidos adjacentes.

#### **1.4 Cinomose**

Chrisman (1985) explica que a cinomose é causada por um paramixovírus responsável por infectar vários tipos de tecidos, incluindo os do trato respiratório, gastrointestinal, tegumentar e sistema nervoso, causando pneumonia, gastroenterite, hiperqueratose e meningoencefalite não supurativa. De acordo com Braund (1994) não há predileção para sexo, idade ou raça, e em cães jovens e não vacinados, o acometimento neurológico é precedido de outros distúrbios como os respiratórios e os

gastrointestinais, e os sinais neurológicos podem aparecer durante o acometimento sistêmico ou após a cura da manifestação inicial.

No que se refere ao sistema nervoso, várias manifestações podem ser encontradas e, sendo assim, é preciso fazer um diagnóstico diferencial, já que muitas outras doenças acometem o sistema nervoso central.

Fenner (1995) indica que, quanto às vias de transmissão, a infecção ocorre principalmente através da inoculação por aerossóis, cujos vírus replicam-se nas tonsilas e linfonodos dos brônquios, e em seguida infectam linfócitos, que são responsáveis pela sua disseminação. No caso de uma resposta imune inapropriada, a moléstia clínica se desenvolve, invariavelmente, e, nestes casos os linfócitos infectados penetram no SNC, cruzando a BHE. Logo após haver penetrado no sistema nervoso central, o vírus deixa os linfócitos e penetra na glia da substância branca, replicando-se por mecanismo não identificado, podendo causar lesões de desmielinização importantes. Segundo Jones et al. (2000) estas lesões desmielinizantes podem ser detectadas por meio de análise microscópica e variam em intensidade e abrangência, numa relação direta com a gravidade e duração da moléstia clínica. E, ainda, relatam a possibilidade do achado de inclusões intracitoplasmáticas no sistema nervoso e em outros órgãos, como um achado do diagnóstico, mas que não exclui a possibilidade da cinomose, quando tal achado se faz ausente.

Estudos sobre enzimologia e isoenzimologia líquóricas em cães, a fim de se detectar lesões neurológicas, são raros, havendo assim, a necessidade de se explorar a validade da utilização de tais testes enzimáticos líquóricos, não só para a constatação de lesões estruturais no SNC, mas também a sua relação com o prognóstico do quadro clínico. Dentro deste contexto, planejou-se o ensaio em tela tendo como escopo principal a avaliação das atividades das enzimas LDH, AST, CK e CK-BB em amostras líquóricas de cães acometidos por cinomose correlacionando-as com achados histopatológicos de vários segmentos do sistema nervoso central.

## **2. MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1 Animais**

Para o desenvolvimento do protocolo experimental os animais foram reunidos em três grupos distintos, sendo o grupo G1 constituído por animais controle e os grupos G2 e G3 constituídos por animais com cinomose, como descritos a seguir.

Grupo G1 – 10 cães, adultos, sem raça definida, machos ou fêmeas, foram obtidos junto à rotina do Serviço Ambulatorial de Clínica Cirúrgica de Pequenos Animais do Hospital Veterinário "Governador Laudo Natel" - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP – Câmpus de Jaboticabal, os quais foram triados dentre animais que vinham a óbito por motivos não-infecciosos que não houvesse comprometimento do tecido nervoso central. O estado de higidez do material biológico requerido foi avaliado pelo exame do líquido cefalorraquidiano e posterior análise histopatológica das estruturas cerebrais (grupo controle).

Grupos G2 e G3 – 20 cães jovens ou adultos, machos ou fêmeas, sem raça definida, portadores do vírus da cinomose com sinais neurológicos, foram obtidos junto a rotina do Serviço Ambulatorial da Clínica Médica de Pequenos Animais do Hospital Veterinário da FCAV-UNESP - Campus de Jaboticabal, apresentando pelo menos um dentre os sintomas neurológicos, incluindo convulsões, paresia, ataxia, mioclonia, hipermetria, demência ou andar em círculos ou nistagmo. Somente foram utilizados neste grupo os animais aos quais foi indicada a eutanásia, pelo péssimo estado clínico do animal, com o consentimento do proprietário do mesmo. O grupo G2 foi integrado por animais que apresentavam elevações discretas nas atividades das enzimas LDH, AST, CK –T e CK-BB e o G3 por cães que apresentaram elevações acentuadas nas atividades das enzimas supracitadas.

Os animais pertencentes ao grupo com cinomose foram selecionados com base no exame físico aliado a análises laboratoriais complementares, inclusive positividade na sorologia, para determinação de anticorpos contra o vírus da cinomose, feita através da utilização de conjunto de reagentes apropriados (ImmunoComb<sup>1</sup>). Além disso, o estado neurológico de tais animais foi comprovado por intermédio da análise

histopatológica, com conseqüente verificação de lesões e/ou corpúsculos de inclusão compatíveis com a cinomose.

## **2.2 Colheita do LCE**

O LCR foi obtido por punção da cisterna magna, com o auxílio de agulhas (25x8) sendo, a seguir, transferido para frascos de vidro para avaliação após 30 minutos da colheita. Para tanto, os animais foram previamente tranqüilizados com Levomepromazina (Neozine<sup>2</sup>) na dose de 1,0mg/kg e posteriormente propofol (Propofol<sup>3</sup>) na dose de 5,0mg/kg, respeitando-se a dose necessária até a perda dos reflexos. Após a colheita do LCE, seguia-se a eutanásia do animal com cloreto de potássio a 10%, por via endovenosa.

## **2.3 Avaliação Físico-Química do LCE**

O aspecto e a cor do LCE foram avaliados comparando-se o tubo contendo a amostra com outro tubo de água destilada, ambos contra uma superfície de cor branca com letras impressas. A densidade foi obtida por refratometria (Refratômetro – ATAGO<sup>4</sup>) e os valores de pH foram determinados mediante uso de tiras indicadoras MERCK<sup>5</sup>.

<sup>1</sup> Biogal ImmunoComb® - Organics do Brasil – São Paulo - Brasil

<sup>2</sup> Neozine® - Rhodia Farma – São Paulo - Brasil

<sup>3</sup> Propofol® - União Química Farmacêuticos Ltda – São Paulo - Brasil.

<sup>4</sup> Atago Co LTD – Tokyo - Japão

<sup>5</sup> Merck do Brasil - Rio de Janeiro - Brasil

**2.3.1 Avaliação Proteica do LCE**  
A determinação dos valores de proteínas totais foi conduzida com auxílio de conjunto de reagentes Sensi Prot (Labtest<sup>6</sup>), pelo método do vermelho de pirogalol, sendo as leituras realizadas em aparelho analisador bioquímico (LABQUEST<sup>6</sup>).

### **2.3.2 Avaliação Enzimática da CK, LDH e AST Totais e CK-BB do LCE**

As determinações das atividades de creatina quinase, lactato desidrogenase e aspartato aminotransferase foram realizadas com auxílio de conjunto de reagentes (Labtest), por método cinético, sendo as leituras realizadas em aparelho analisador bioquímico (LABQUEST).

As determinações das atividades líquóricas de creatina quinase BB foram realizadas com auxílio de conjunto de reagentes CK-MB (Labtest), o qual possui anticorpos anti-CK-M e estima a concentração de CK-MB sérica, pela avaliação do monômero CK-B, sendo então viável para a análise de CK-BB líquórica. Utilizou-se o método cinético, sendo as leituras realizadas em aparelho analisador bioquímico (LABQUEST).

Estes procedimentos analítico-laboratoriais foram realizados nas dependências do Laboratório de Patologia Clínica do Hospital Veterinário “Governador Laudo Natel” (FCAVJ-UNESP).

## **2.4 Avaliação Histopatológica do Sistema Nervoso Central**

Após a eutanásia dos animais, seguiu-se o rebatimento da caixa craniana e corte longitudinal da coluna vertebral para a retirada do SNC, o qual foi acondicionado e fixado em solução de formaldeído tamponado com fosfato a 4%, pH 7,2 (Formol tamponado com fosfatos a 10%), numa relação fixador/órgão 20:1, por 24 horas.

Após a fixação, fragmentos das várias regiões do SNC (córtex cerebral, hipocampo, região periventricular e medulas cervical, torácica e lombar) foram fixados e processados conforme rotina convencional de processamento histológico do Laboratório de Histotecnologia do Departamento de Patologia Veterinária da FCAV-UNESP, com desidratação em diluições com concentrações crescentes de álcoois e diafanização em xilol, para inclusão em blocos de parafina histológica.

Os cortes de tecidos foram obtidos por microtomia numa espessura de 3  $\mu$ m e foram dispostos em lâminas de vidro. Subsequentemente, as lâminas foram mantidas em estufa a 60 °C por 1 hora e submetidas à desparafinização em xilol e reidratação em diluições decrescentes de álcoois.

Os cortes de tecido foram corados pela hematoxilina e eosina (HE), desidratados, montados em lamínula e observados em microscópio de luz.

## **2.5 Análise Estatística**

Os resultados obtidos para as diferentes características líquóricas estudadas foram analisados estatisticamente de acordo com o método ANOVA de análise de variância, sendo as médias consideradas estatisticamente significativas comparadas pelo teste de comparação múltipla Student-Newman-Keuls a 5% de probabilidade (PIMENTEL GOMES, 1987).

### **3. RESULTADOS**

Os valores médios obtidos para os diferentes parâmetros do LCE, tais como coloração, aspecto, densidade, pH, proteínas totais, lactato desidrogenase, aspartato aminotransferase, creatina quinase total e creatina quinase BB de todas as parcelas experimentais, estão apresentados nas tabelas de números 01 a 07 e nas figuras de 01 a 08.

#### **3.1 Avaliação Líquórica**

##### **3.1.1 Coloração e Aspecto**

Todas as amostras coletadas, referentes aos animais dos grupos experimentais G1, G2 e G3 apresentaram-se incolores e límpidas.

##### **3.1.2 Densidade**

Os valores médios obtidos para a densidade estão apresentados na tabela e correspondente figura 01.

Os resultados obtidos não apresentaram diferenças significativas ( $p > 0,05$ ) entre os diferentes grupos experimentais (G1, G2, G3).

### **3.1.3 pH**

Os valores médios obtidos para o pH estão apresentados na tabela e correspondente figura 02.

Os valores médios obtidos para o pH comportaram-se de forma semelhante, entre os grupos de animais (G1, G2 e G3), não apresentando diferenças significativas entre eles.

### **3.1.4 Proteínas Totais**

Os valores médios obtidos para as proteínas totais estão apresentados na tabela e correspondente figura 03.

Notaram-se diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre os animais dos três grupos estudados (G1, G2 e G3), sendo que os valores encontrados para os animais do grupo G2 foram mais altos do que aqueles do grupo G1 e menores que os do grupo G3.

### **3.1.5 Lactato Desidrogenase**

Os valores médios obtidos para a atividade líquórica da LDH estão apresentados na tabela e correspondente figura 04

Em relação às atividades líquóricas da lactato desidrogenase, foram observadas semelhanças ( $p > 0,05$ ) entre os animais dos grupos G1 e G2, cujos valores revelaram-se estatisticamente inferiores ( $p < 0,05$ ) àqueles apresentados por animais do grupo G3.

### **3.1.6 Aspartato Aminotransferase**

Os valores médios obtidos para a atividade líquórica da AST estão apresentados na tabela e correspondente figura 05

Em relação às atividades da enzima líquórica aspartato aminotransferase foi observada semelhança ( $p > 0,05$ ) entre os animais dos grupos G1 e G2 e diferença

estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ) entre estes e os cães do grupo G3, cuja atividade mostrou-se mais elevada.

### **3.1.7 Creatina Quinase Total**

Os valores médios obtidos para a atividade líquórica da CK total estão apresentados na tabela e correspondente figura 06

Foi verificada diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre os animais do grupo G3, cujas atividades de creatina quinase total mostraram-se elevadas, porém não houve diferença estatisticamente significativa ( $p > 0,05$ ) entre os animais dos grupos G1 e G2.

### **3.1.8 Creatina Quinase BB**

Os valores médios obtidos para a atividade líquórica da CK - BB estão apresentados na tabela e correspondente figura 07.

As atividades enzimáticas de creatina quinase BB revelaram-se significativamente aumentados ( $p < 0,05$ ) para os animais do grupo G3, comparados àqueles encontrados para os animais dos grupos experimentais G1 e G2, que por sua vez se mantiveram semelhantes ( $p > 0,05$ ) entre si.

### **3.1.9 Creatina Quinase Total X Creatina Quinase BB**

Os valores obtidos para a atividade líquórica da enzima creatina quinase total foram bem próximos àqueles encontrados para sua isoenzima creatina quinase BB, como pode ser observado na figura 08.

TABELA 01 - Valores médios e respectivos desvios-padrão obtidos para densidade liquórica de cães normais (controle G1) e com cinomose, com atividade enzimática discreta (G2) e com atividade enzimática acentuada (G3), atendidos junto à rotina do serviço ambulatorial do Hospital Veterinário "Governador Laudo Natel" - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP – Câmpus de Jaboticabal, Jaboticabal (SP), 2006.

<b>Densidade</b>			
Grupos	n	Média	Desvio Padrão
G1	10	1,0055A	0,0008
G2	10	1,0059A	0,0019
G3	10	1,0062A	0,0012

Médias de uma mesma coluna seguidas por letras maiúsculas iguais não diferem entre si ( $p > 0,05$ ) e estabelecem a comparação entre os diferentes grupos experimentais.

G1 – Grupo controle.

G2 – Grupo de animais com cinomose e atividade enzimática liquórica discreta.

G3 – Grupo de animais com cinomose e atividade enzimática liquórica acentuada.

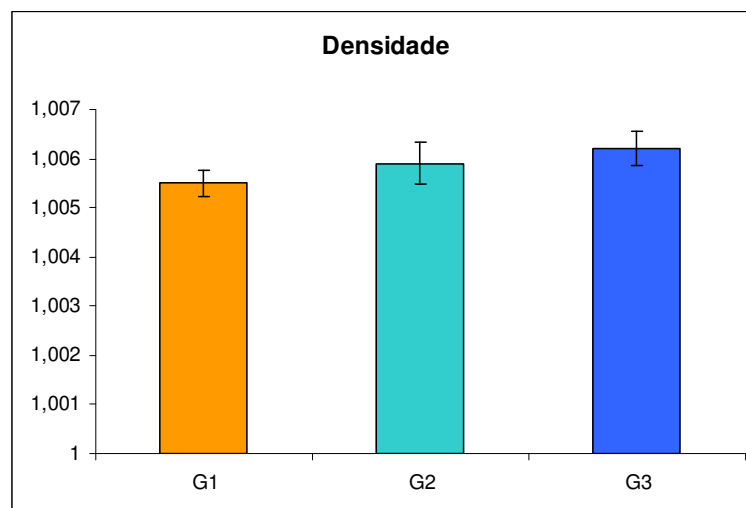


FIGURA 01 - Variação dos valores médios obtidos para densidade liquórica em cães normais (controle G1) e com cinomose, com atividade enzimática discreta (G2) e com atividade enzimática acentuada (G3), atendidos junto à rotina do serviço ambulatorial do Hospital Veterinário "Governador Laudo Natel" - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP – Câmpus de Jaboticabal, Jaboticabal (SP), 2006.

TABELA 02 - Valores médios e respectivos desvios-padrão obtidos para pH liquórico de cães normais (controle G1) e com cinomose, com atividade enzimática discreta (G2) e com atividade enzimática

acentuada (G3), atendidos junto à rotina do serviço ambulatorial do Hospital Veterinário "Governador Laudo Natel" - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP – Câmpus de Jaboticabal, Jaboticabal (SP), 2006.

<b>pH</b>			
Grupos	n	Média	Desvio Padrão
G1	10	8,00A	0
G2	10	8,05A	0,16
G3	10	8,05A	0,16

Médias de uma mesma coluna seguidas por letras maiúsculas iguais não diferem entre si ( $p > 0,05$ ) e estabelecem a comparação entre os diferentes grupos experimentais.

G1 – Grupo controle.

G2 – Grupo de animais com cinomose e atividade enzimática liquórica discreta.

G3 – Grupo de animais com cinomose e atividade enzimática liquórica acentuada.

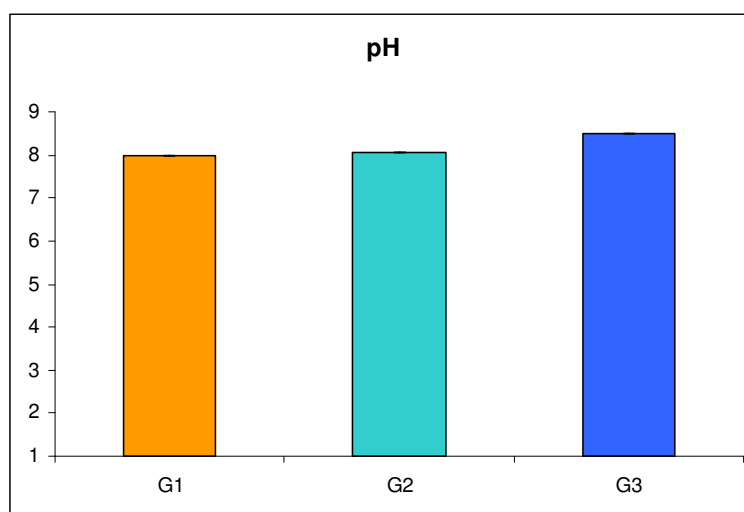


FIGURA 02 - Variação dos valores médios obtidos para pH liquórico em cães normais (controle G1) e com cinomose, com atividade enzimática discreta (G2) e com atividade enzimática acentuada (G3), atendidos junto à rotina do serviço ambulatorial do Hospital Veterinário "Governador Laudo Natel" - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP – Câmpus de Jaboticabal. Jaboticabal (SP), 2006.

TABELA 03 - Valores médios e respectivos desvios-padrão obtidos para proteínas totais liquóricas de cães normais (controle G1) e com cinomose, com atividade enzimática discreta (G2) e com atividade enzimática acentuada (G3), atendidos junto à rotina do serviço ambulatorial do Hospital Veterinário "Governador Laudo Natel" - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP – Câmpus de Jaboticabal, Jaboticabal (SP), 2006.

<b>Proteínas Totais (mg/dL)</b>			
Grupos	n	Média	Desvio Padrão
G1	10	29,1A	7,0
G2	10	61,2B	28,0
G3	10	86,2C	31,2

Médias de uma mesma coluna seguidas por letras maiúsculas iguais não diferem entre si ( $p > 0,05$ ) e estabelecem a comparação entre os diferentes grupos experimentais.

G1 – Grupo controle.

G2 – Grupo de animais com cinomose e atividade enzimática liquórica discreta.

G3 – Grupo de animais com cinomose e atividade enzimática liquórica acentuada.

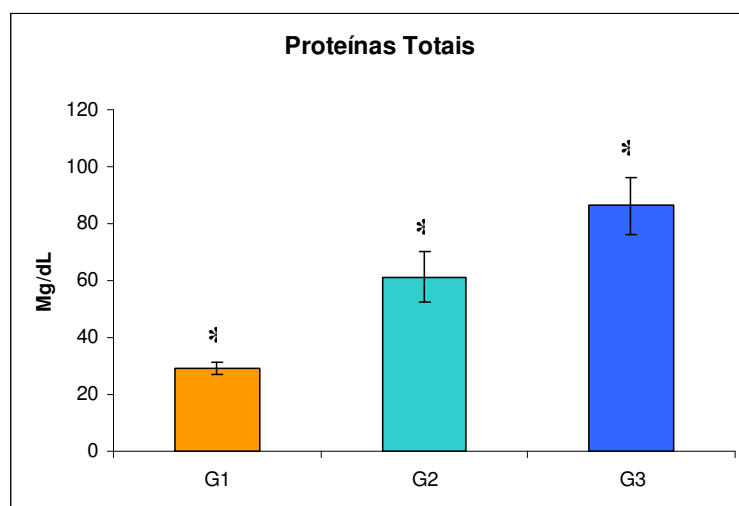


FIGURA 03 - Variação dos valores médios obtidos para proteínas totais liquóricas em cães normais (controle G1) e com cinomose, com atividade enzimática discreta (G2) e com atividade enzimática acentuada (G3), atendidos junto à rotina do serviço ambulatorial do Hospital Veterinário "Governador Laudo Natel" - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP – Câmpus de Jaboticabal, Jaboticabal (SP). 2006.

TABELA 04 - Valores médios e respectivos desvios-padrão obtidos para lactato desidrogenase liquórica de cães normais (controle G1) e com cinomose, com atividade enzimática discreta (G2) e com atividade enzimática acentuada (G3), atendidos junto à rotina do serviço ambulatorial do Hospital Veterinário "Governador Laudo Natel" - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP – Câmpus de Jaboticabal, Jaboticabal (SP), 2006

<b>Lactato Desidrogenase (U/L)</b>			
Grupos	n	Média	Desvio Padrão
G1	10	0A	0
G2	10	6,4A	12,8
G3	10	187,4B	89,1

Médias de uma mesma coluna seguidas por letras maiúsculas iguais não diferem entre si ( $p > 0,05$ ) e estabelecem a comparação entre os diferentes grupos experimentais.

G1 – Grupo controle.

G2 – Grupo de animais com cinomose e atividade enzimática liquórica discreta.

G3 – Grupo de animais com cinomose e atividade enzimática liquórica acentuada.

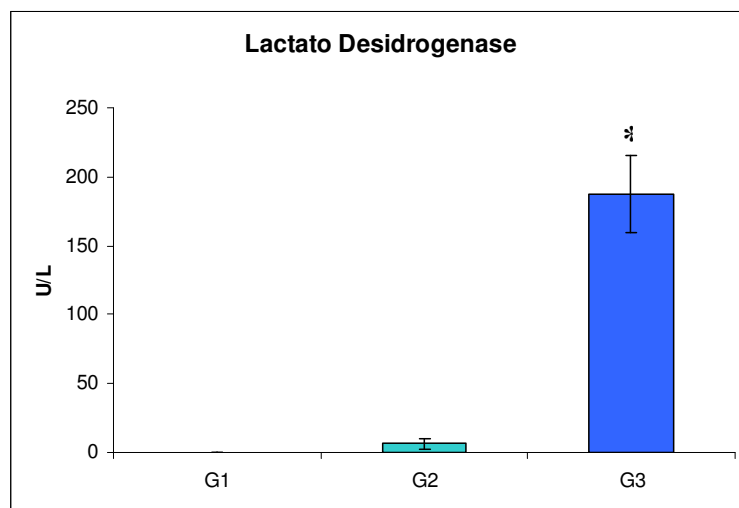


FIGURA 04 - Variação dos valores médios obtidos para lactato desidrogenase liquórica em cães normais (controle G1) e com cinomose, com atividade enzimática discreta (G2) e com atividade enzimática acentuada (G3), atendidos junto à rotina do serviço ambulatorial do Hospital Veterinário "Governador Laudo Natel" - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP – Câmpus de Jaboticabal, Jaboticabal (SP), 2006.

TABELA 05 - Valores médios e respectivos desvios-padrão obtidos para aspartato aminotransferase liquórica de cães normais (controle G1) e com cinomose, com atividade enzimática discreta (G2) e com atividade enzimática acentuada (G3), atendidos junto à rotina do serviço ambulatorial do Hospital Veterinário "Governador Laudo Natel" - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP – Câmpus de Jaboticabal, Jaboticabal (SP), 2006.

<b>Aspartato Aminotransferase (U/L)</b>			
Grupos	n	Média	Desvio Padrão
G1	10	19,2A	11,3
G2	10	39,8A	24,6
G3	10	130,8B	71,8

Médias de uma mesma coluna seguidas por letras maiúsculas iguais não diferem entre si ( $p > 0,05$ ) e estabelecem a comparação entre os diferentes grupos experimentais.

G1 – Grupo controle.

G2 – Grupo de animais com cinomose e atividade enzimática liquórica discreta.

G3 – Grupo de animais com cinomose e atividade enzimática liquórica acentuada.

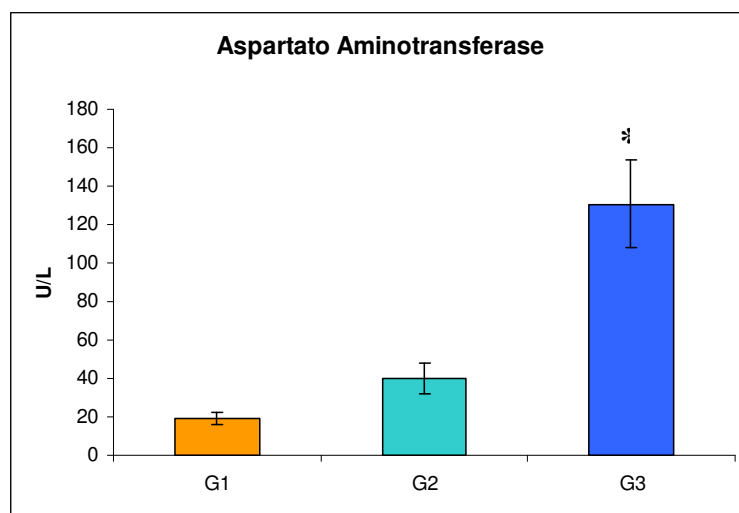


FIGURA 05 - Variação dos valores médios obtidos para aspartato aminotransferase liquórica em cães normais (controle G1) e com cinomose, com atividade enzimática discreta (G2) e com atividade enzimática acentuada (G3), atendidos junto à rotina do serviço ambulatorial do Hospital Veterinário "Governador Laudo Natel" - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP – Câmpus de Jaboticabal. Jaboticabal (SP), 2006

TABELA 06 - Valores médios e respectivos desvios-padrão obtidos para creatina quinase total liquórica de cães normais (controle G1) e com cinomose, com atividade enzimática discreta (G2) e com atividade enzimática acentuada (G3), atendidos junto à rotina do serviço ambulatorial do Hospital Veterinário "Governador Laudo Natel" - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP – Câmpus de Jaboticabal, Jaboticabal (SP), 2006.

<b>Creatina Quinase Total (U/L)</b>			
<b>Grupos</b>	<b>n</b>	<b>Média</b>	<b>Desvio Padrão</b>
G1	10	25,6A	3,4
G2	10	57,3A	12,0
G3	10	160,5B	128,8

Médias de uma mesma coluna seguidas por letras maiúsculas iguais não diferem entre si ( $p > 0,05$ ) e estabelecem a comparação entre os diferentes grupos experimentais.

G1 – Grupo controle.

G2 – Grupo de animais com cinomose e atividade enzimática liquórica discreta.

G3 – Grupo de animais com cinomose e atividade enzimática liquórica acentuada.

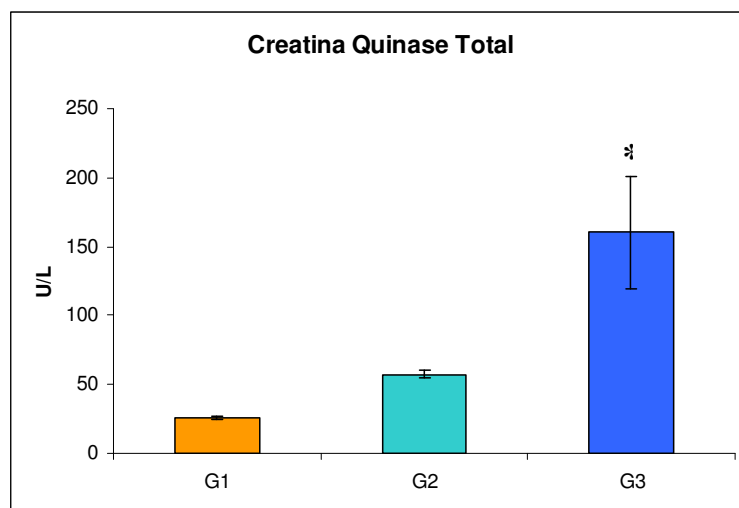


FIGURA 06 - Variação dos valores médios obtidos para creatina quinase total liquórica em cães normais (controle G1) e com cinomose, com atividade enzimática discreta (G2) e com atividade enzimática acentuada (G3), atendidos junto à rotina do serviço ambulatorial do Hospital Veterinário "Governador Laudo Natel" - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP – Câmpus de Jaboticabal, Jaboticabal (SP), 2006.

TABELA 07 - Valores médios e respectivos desvios-padrão obtidos para creatina quinase BB líquórica de cães normais (controle G1) e com cinomose, com atividade enzimática discreta (G2) e com atividade enzimática acentuada (G3), atendidos junto à rotina do serviço ambulatorial do Hospital Veterinário "Governador Laudo Natel" - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP – Câmpus de Jaboticabal, Jaboticabal (SP), 2006.

<b>Creatina Quinase BB (U/L)</b>			
Grupos	n	Média	Desvio Padrão
G1	10	24,1A	4,6
G2	10	55,0A	15,0
G3	10	157,0B	127,2

Médias de uma mesma coluna seguidas por letras maiúsculas iguais não diferem entre si ( $p > 0,05$ ) e estabelecem a comparação entre os diferentes grupos experimentais.

G1 – Grupo controle.

G2 – Grupo de animais com cinomose e atividade enzimática líquórica discreta.

G3 – Grupo de animais com cinomose e atividade enzimática líquórica acentuada.

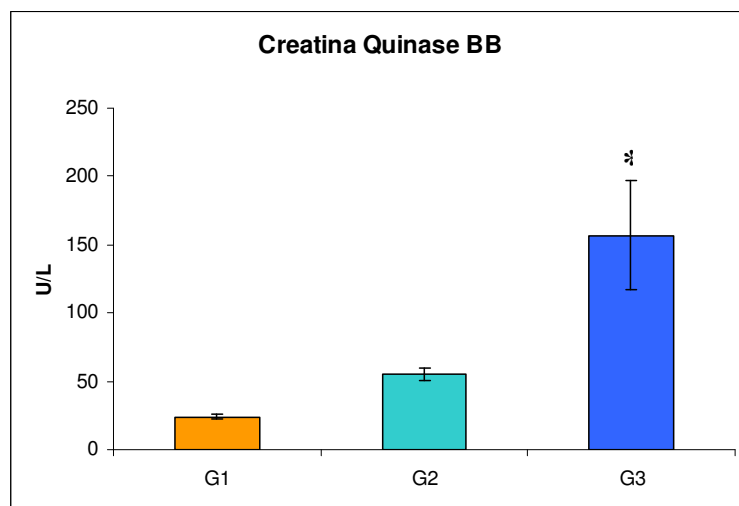


FIGURA 07 - Variação dos valores médios obtidos para creatina quinase BB líquórica em cães normais (controle G1) e com cinomose, com atividade enzimática discreta (G2) e com atividade enzimática acentuada (G3), atendidos junto à rotina do serviço ambulatorial do Hospital Veterinário "Governador Laudo Natel" - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP – Câmpus de Jaboticabal, Jaboticabal (SP), 2006.

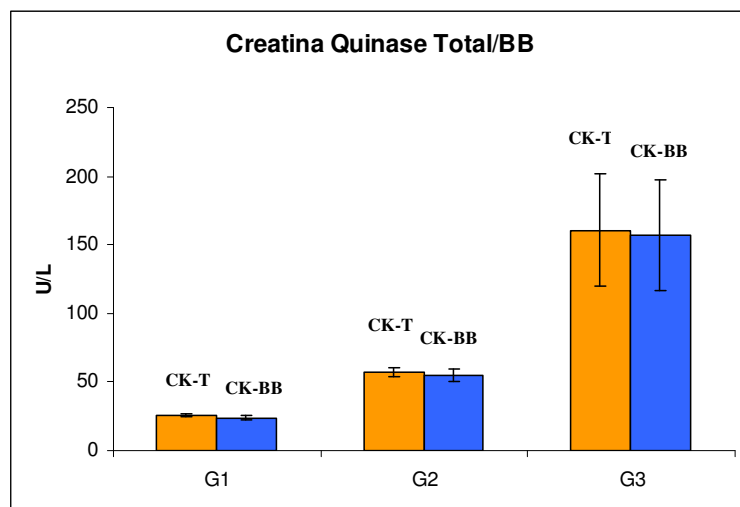


FIGURA 08 - Variação dos valores médios obtidos para creatina quinase total e BB líquóricas em cães normais (controle G1) e com cinomose, com atividade enzimática discreta (G2) e com atividade enzimática acentuada (G3), atendidos junto à rotina do serviço ambulatorial do Hospital Veterinário "Governador Laudo Natel" - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP – Câmpus de Jaboticabal, Jaboticabal (SP), 2006.

### **3.2 Avaliação Histopatológica do Sistema Nervoso Central**

Para a avaliação histopatológica foram consideradas, principalmente, as presenças dos corpúsculos de inclusão da cinomose e lesões desmielinizantes nos diferentes fragmentos obtidos (córtex, cerebelo, região periventricular, hipocampo, medula cervical, torácica e lombar), as quais foram classificadas quanto à abrangência, sendo focais, multifocais e difusas e quanto à intensidade, sendo leves, moderadas e severas para os três grupos estudados.

A presença dos corpúsculos de inclusão da cinomose ocorreu nos dois grupos estudados, sendo que sete animais do G2 e sete animais do G3 apresentaram estes corpúsculos, em pelo menos um fragmento, sendo que estes foram observados em fragmentos de cerebelo de três animais do G2 e cinco do G3, na região periventricular de três animais do G2 e um do G3 e ainda em um animal do G2 e um animal do G3 no hipocampo (Figura 14).

Os animais do grupo controle (G1) não apresentaram lesões nos diferentes fragmentos do sistema nervoso central, indicando a sua integridade tecidual.

Os resultados obtidos para os animais com cinomose pertencentes aos grupos dois (atividade enzimática liquórica discreta) e três (atividade enzimática liquórica acentuada), estão apresentados nas tabelas 8 a 11 e figuras 9 a 12.

Foi possível observar que os animais do G2 apresentaram um maior número de lesões desmielinizantes focais, enquanto que os animais do G3 apresentaram um maior número de lesões multifocais e difusas.

Quanto à localização das lesões, observou-se em G2 um número menor de fragmentos lesados, sendo o córtex, cerebelo e a região periventricular, os mais acometidos, já os animais do grupo G3 apresentaram, além das regiões acima citadas, o hipocampo dentre os mais lesados (Figuras 15.16 e 17).

Já com relação à intensidade das lesões desmielinizantes, observou-se que os animais dos dois grupos apresentaram lesões moderadas a severas, na sua maioria, ressaltando-se ainda que nos cães do G3 as lesões desmielinizantes foram mais severas e que as lesões leves foram raras.

Ainda foi possível observar respostas inflamatórias importantes caracterizadas pelos infiltrados inflamatórios linfocitários, manguitos perivasculares, os quais ocorreram com maior frequência nos animais do G2 (Figuras 18 e 19).

TABELA 08 - Valores de scores e absolutos obtidos para lesões desmielinizantes focais, multifocais e difusas nos diferentes fragmentos do sistema nervoso central nos 10 cães com cinomose e atividade enzimática discreta (G2) atendidos junto à rotina do serviço ambulatorial do Hospital Veterinário "Governador Laudo Natel" - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP – Câmpus de Jaboticabal. Jaboticabal (SP), 2006.

Fragmento do SNC	Lesões focais (1)	Lesões multifocais (2)	Lesões difusas (3)	Total
Córtex	5 (n=5)	0 (n=0)	3 (n=1)	8 (n=6)
Cerebelo	4 (n=4)	12 (n=6)	0 (n=0)	16 (n=10)
Região periventricular	5 (n=5)	8 (n=4)	0 (n=0)	13 (n=9)
Hipocampo	1 (n=1)	0 (n=0)	3 (n=1)	4 (n=2)
Medula cervical	0 (n=0)	0 (n=0)	3 (n=1)	3 (n=1)
Medula torácica	0 (n=0)	0 (n=0)	3 (n=1)	3 (n=1)
Medula lombar	1 (n=1)	0 (n=0)	3 (n=1)	4 (n=2)
<b>Total</b>	<b>16</b>	<b>20</b>	<b>15</b>	<b>51</b>

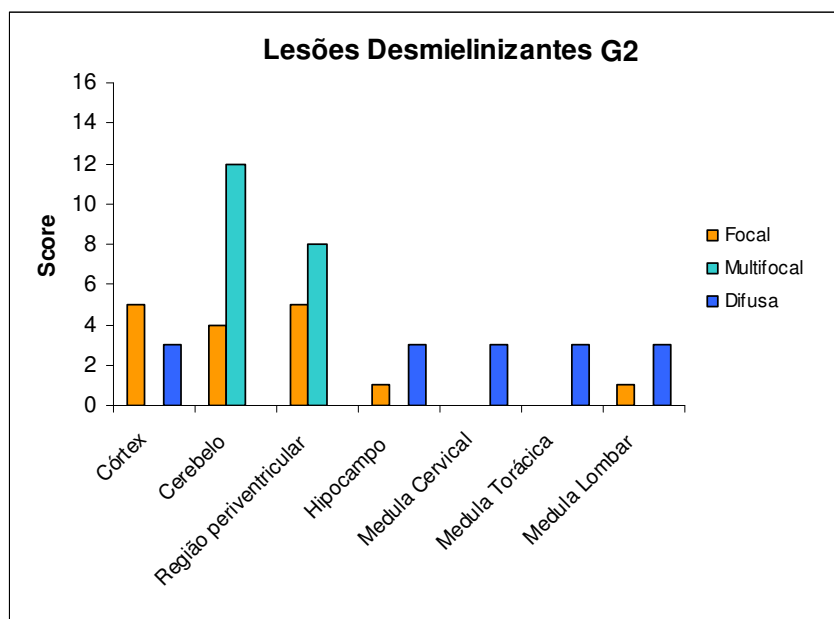


FIGURA 09 - Variação dos valores absolutos obtidos para as lesões desmielinizantes focais, multifocais e difusas nos diferentes fragmentos do sistema nervoso central dos cães com cinomose e atividade enzimática discreta (G2), atendidos junto à rotina do serviço ambulatorial do Hospital Veterinário "Governador Laudo Natel" - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP – Câmpus de Jaboticabal. Jaboticabal (SP), 2006.

TABELA 09 - Valores de scores e absolutos obtidos para lesões desmielinizantes focais, multifocais e difusas nos diferentes fragmentos do sistema nervoso central nos 10 cães com cinomose e atividade enzimática acentuada (G3) atendidos junto à rotina do serviço ambulatorial do Hospital Veterinário "Governador Laudo Natel" - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP – Câmpus de Jaboticabal. Jaboticabal (SP), 2006.

Fragmento do SNC	Lesões focais (1)	Lesões multifocais (2)	Lesões difusas (3)	Total
Córtex	1 (n=1)	4 (n=2)	9 (n=3)	14 (n=6)
Cerebelo	1 (n=1)	8 (n=4)	15 (n=5)	24 (n=10)
Região periventricular	1 (n=1)	12 (n=6)	9 (n=3)	22 (n=10)
Hipocampo	3 (n=3)	4 (n=2)	6 (n=2)	13 (n=7)
Medula cervical	2 (n=2)	2 (n=1)	0 (n=0)	4 (n=3)
Medula torácica	1 (n=1)	2 (n=1)	0 (n=0)	3 (n=2)
Medula lombar	2 (n=2)	2 (n=1)	0 (n=0)	4 (n=3)
Total	11	34	39	84

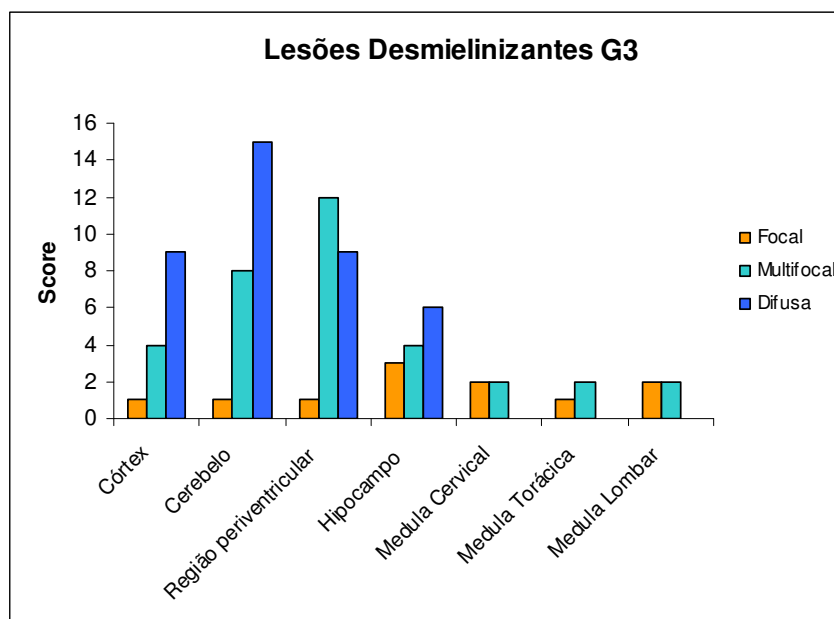


FIGURA 10 - Variação dos valores obtidos para as lesões desmielinizantes focais, multifocais e difusas nos diferentes fragmentos do sistema nervoso central dos cães com cinomose e atividade enzimática acentuada (G3), atendidos junto à rotina do serviço ambulatorial do Hospital Veterinário "Governador Laudo Natel" - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP – Câmpus de Jaboticabal. Jaboticabal (SP), 2006.

TABELA 10 - Valores de scores e absolutos obtidos para lesões desmielinizantes leves, moderadas e severas nos diferentes fragmentos do sistema nervoso central nos 10 cães com cinomose e atividade enzimática discreta (G2) atendidos junto à rotina do serviço ambulatorial do Hospital Veterinário "Governador Laudo Natel" - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP – Câmpus de Jaboticabal. Jaboticabal (SP), 2006.

Fragmento do SNC	Lesões leves (1)	Lesões moderadas (2)	Lesões severas (3)	Total
Córtex	2 (n=2)	0 (n=2)	6 (n=2)	8 (n=6)
Cerebelo	1 (n=1)	8 (n=4)	15 (n=5)	24 (n=10)
Região periventricular	1 (n=1)	8 (n=4)	12 (n=4)	21 (n=9)
Hipocampo	0 (n=0)	4 (n=2)	0 (n=0)	4 (n=2)
Medula cervical	0 (n=0)	2 (n=1)	0 (n=0)	2 (n=1)
Medula torácica	0 (n=0)	2 (n=1)	0 (n=0)	2 (n=1)
Medula lombar	1 (n=1)	2 (n=1)	0 (n=0)	3 (n=2)
<b>Total</b>	<b>5</b>	<b>26</b>	<b>33</b>	<b>64</b>

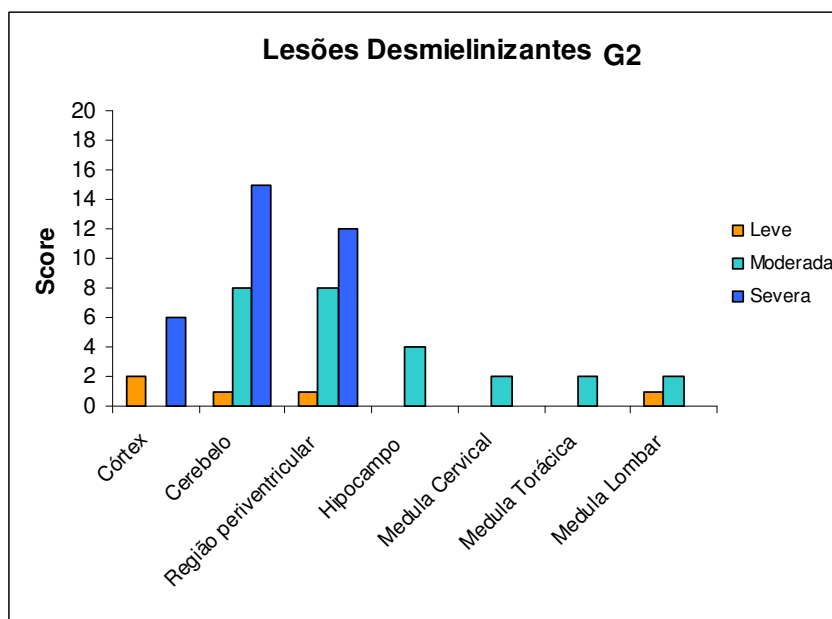


FIGURA 11 - Variação dos valores absolutos obtidos para as lesões desmielinizantes leves, moderadas e severas nos diferentes fragmentos do sistema nervoso central dos cães com cinomose e atividade enzimática discreta (G2), atendidos junto à rotina do serviço ambulatorial do Hospital Veterinário "Governador Laudo Natel" - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP – Câmpus de Jaboticabal. Jaboticabal (SP), 2006.

TABELA 11 – Valores de scores e absolutos obtidos para lesões desmielinizantes leves, moderadas e severas nos diferentes fragmentos do sistema nervoso central nos 10 cães com cinomose e atividade enzimática acentuada (G3) atendidos junto à rotina do serviço ambulatorial do Hospital Veterinário "Governador Laudo Natel" - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP – Câmpus de Jaboticabal. Jaboticabal (SP), 2006.

Fragmento do SNC	Lesões leves (1)	Lesões moderadas (2)	Lesões severas (3)	Total
Córtex	1 (n=1)	6 (n=3)	6 (n=2)	13 (n=6)
Cerebelo	1 (n=1)	6 (n=3)	18 (n=6)	25 (n=10)
Região periventricular	0 (n=0)	8 (n=4)	18 (n=6)	26 (n=10)
Hipocampo	2 (n=2)	6 (n=3)	6 (n=2)	14 (n=7)
Medula cervical	1 (n=1)	0 (n=0)	6 (n=2)	7 (n=3)
Medula torácica	0 (n=0)	2 (n=1)	3 (n=1)	5 (n=2)
Medula lombar	0 (n=0)	0 (n=0)	9 (n=3)	9 (n=3)
<b>Total</b>	<b>5</b>	<b>28</b>	<b>66</b>	<b>99</b>

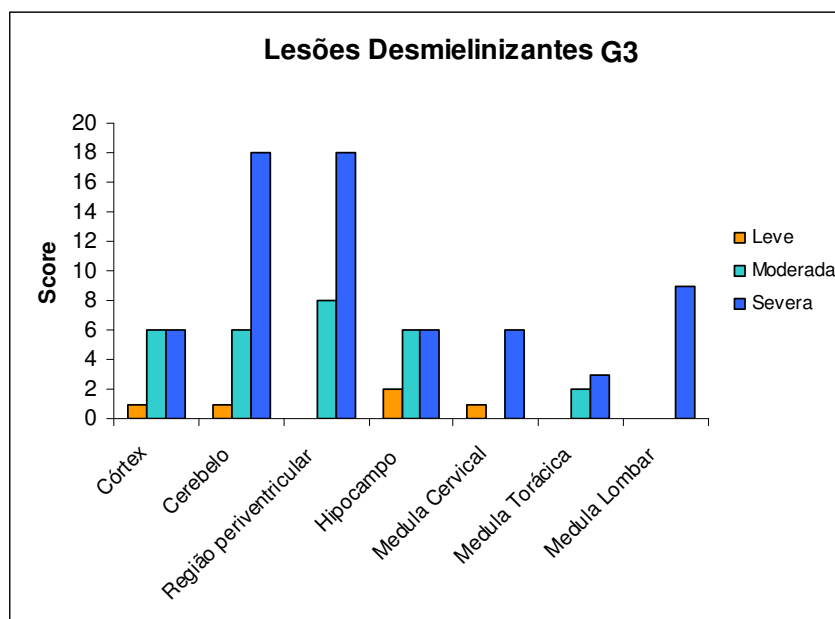


FIGURA 12 - Variação dos valores obtidos para as lesões desmielinizantes leves, moderadas e severas nos diferentes fragmentos do sistema nervoso central dos cães com cinomose e atividade enzimática acentuada (G3), atendidos junto à rotina do serviço ambulatorial do Hospital Veterinário "Governador Laudo Natel" - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP – Câmpus de Jaboticabal. Jaboticabal (SP), 2006.

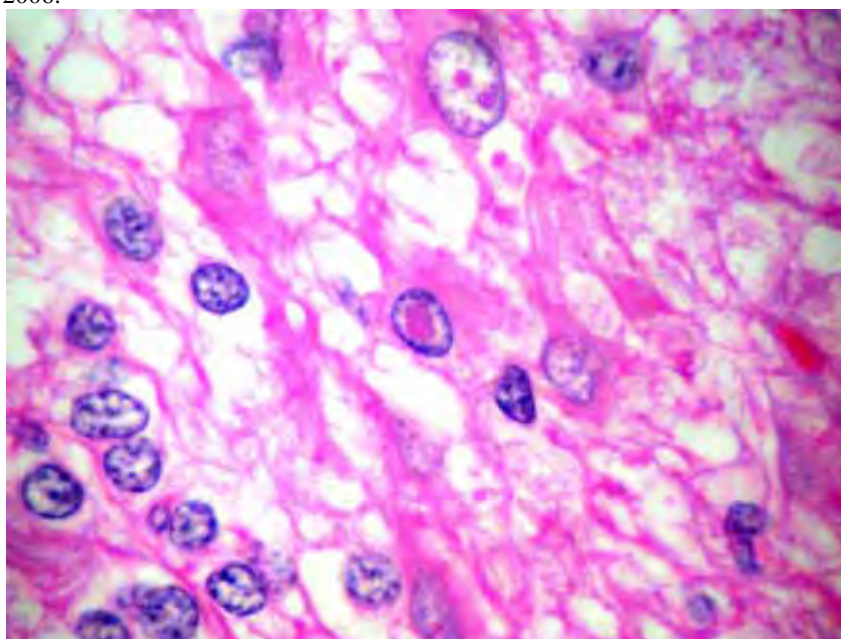


Figura 14: Fotomicrografia da substância branca do cerebelo demonstrando a presença de corpúsculo de inclusão intranuclear em célula nervosa. HE, objetiva de 100 x.

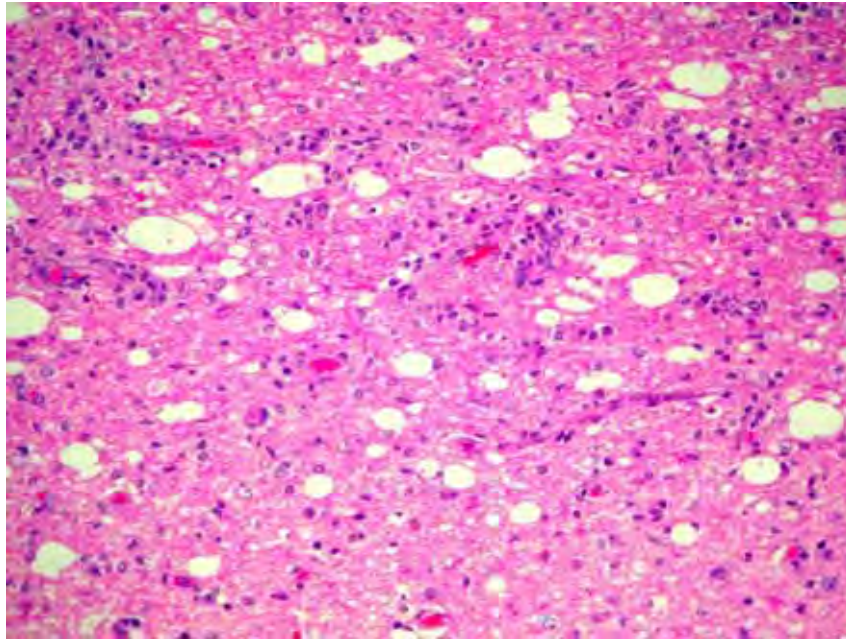


Figura 15: Fotomicrografia da substância branca do córtex cerebral apresentando vacuolização do neuropilo (desmielinização). HE, objetiva de 10 x.

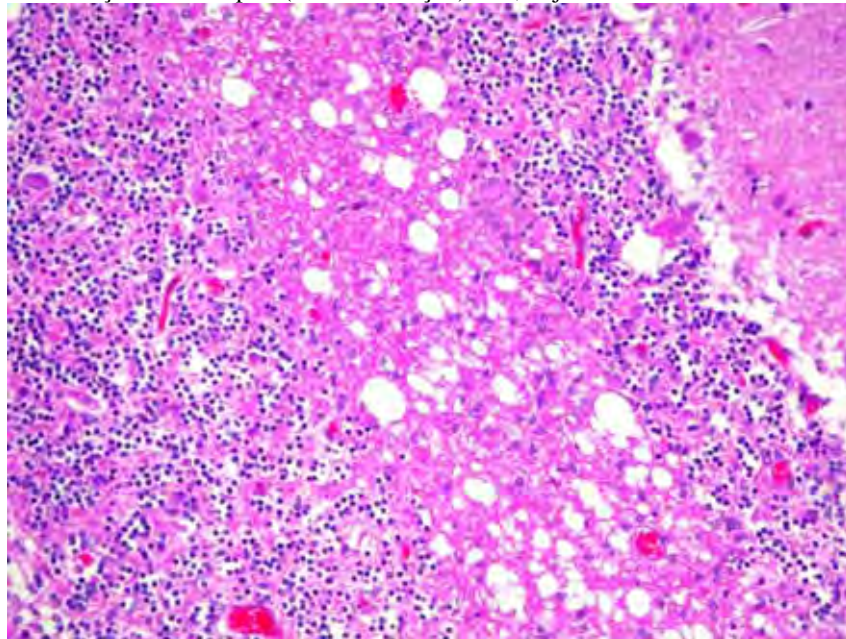


Figura 16: Fotomicrografia de cerebelo apresentando vacuolização da substância branca (desmielinização) e degeneração de neurônios de Purkinje. HE, objetiva de 10x.

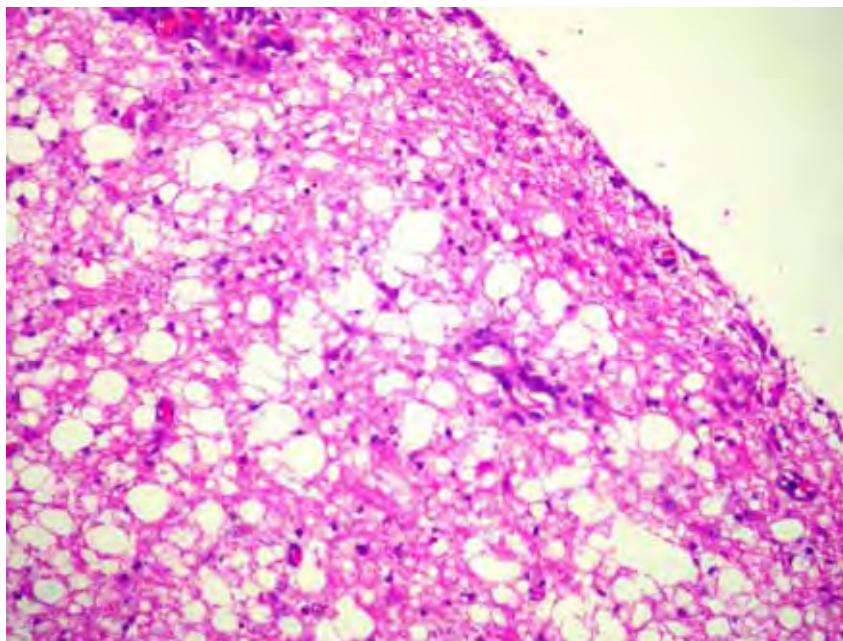


Figura 17: Fotomicrografia da região periventricular (quarto ventrículo) apresentando desmielinização da substância branca. HE, objetiva de 10x.

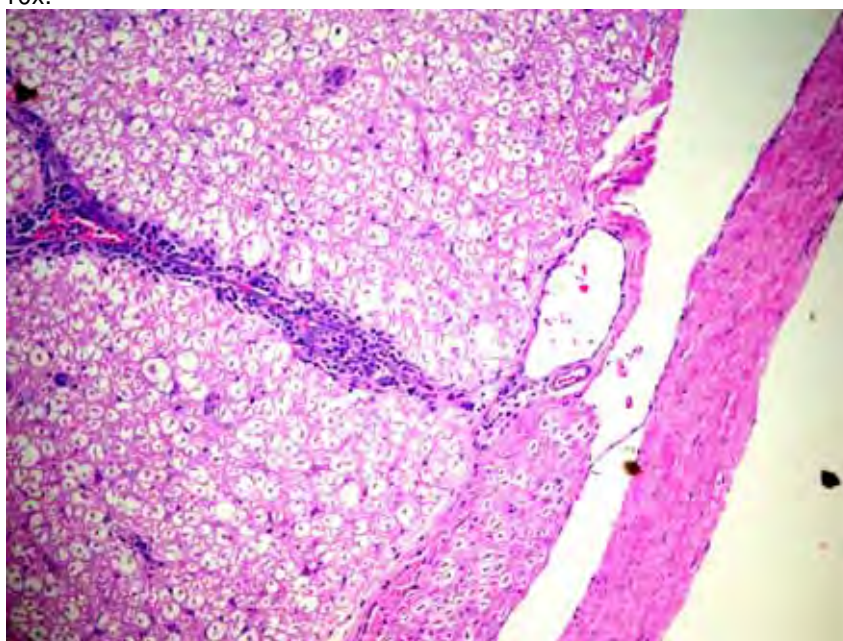


Figura 18: Fotomicrografia da substância branca da medula espinhal (região lombar) apresentando infiltrado inflamatório. HE, objetiva de 10x.

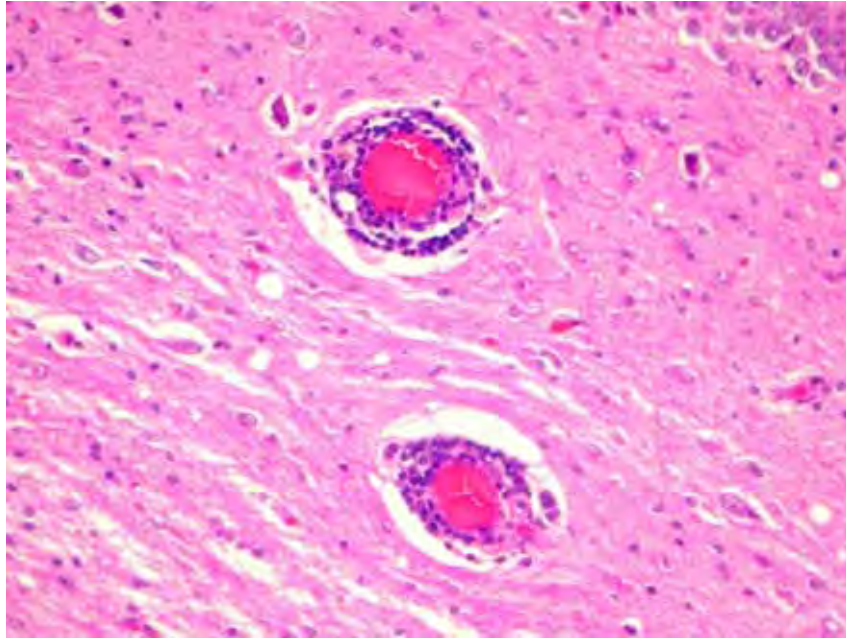


Figura 19: Fotomicrografia da substância branca do hipotálamo com a presença de manguitos perivascularres. HE, objetiva de 40x.

#### 4. DISCUSSÃO

No presente experimento, todas as amostras de LCE coletadas, referentes aos três grupos de animais estudados, G1 (animais sadios), G2 (grupo de animais com cinomose e com elevações discretas de atividades enzimáticas) e G3 (grupo de

animais com cinomose e com elevações acentuadas das atividades enzimáticas) apresentaram-se incolores e límpidas, concordando, com os autores, Coles (1986); Cook ; Denicola (1988); Fernandes (1990), Bailey ; Vernau (1997), os quais referem que amostras líquóricas de animais normais apresentam-se límpidas e incolores, como também corroboram os achados de Alleman et al. (1992) ; Feitosa et al. (1997a) que fazem referência a amostras líquóricas de animais com cinomose, igualmente incolores e límpidas. Apesar de a turbidez líquórica ser atribuída à elevação da contagem celular líquórica por tais autores como, Mayhew ; Beal (1980) ; Oliver ; Lorenz (1997), a pleocitose observada frente à cinomose não foi capaz de conferir turbidez em amostras líquóricas estudadas por Abate et al. (1998) e Gama et al. (2005). Adicionalmente, a turbidez pode ser explicada por aumento de concentrações protéicas líquóricas, como asseverado por Mayhew ; Beal (1980) ; Braund (1994), fato tampouco constatado neste trabalho, independente do grupo experimental estudado, concordando com dados de experimentos realizados em cães com cinomose por Feitosa et al. (1997a), Abate et al. (1998) ; Gama et al. (2005).

Da mesma forma que a coloração e o aspecto, segundo Mayhew ; Beal (1980) ; Chrisman (1985) elevações da densidade do líquido cefalorraquidiano podem ocorrer frente à pleocitose, ou ainda, pelo aumento de seu componente protéico. Entretanto, nos animais estudados neste ensaio não foram observadas diferenças estatisticamente significativas, com relação à densidade, entre grupos, e mesmo tendo animais do grupo G2 e G3 evidenciado valores um pouco maiores que aqueles dos grupos G1, não foram capazes de ultrapassar os limites considerados fisiológicos por Kay (1974) e Feitosa et al. (1997a). Sendo assim, a pleocitose observada em amostras de animais com cinomose por Feitosa et al. (1997a); Gama et al. (2005) não elevaram a densidade, bem como as elevações das concentrações protéicas observadas nas amostras líquóricas dos animais do grupo G2 e G3, deste experimento, também corroborando achados dos mesmos autores.

Os valores médios obtidos para o pH, nos diferentes grupos estudados, não revelaram diferenças estatísticas significativas, corroborando dados de Feitosa et al. (1997a), cujas médias obtidas para o pH, em cães com cinomose, não ultrapassaram

os limites fisiológicos normais reportados por Mayhew; Beal (1980); Chrisman (1985). Estes dados concordam com Bailey ; Vernau (1997), os quais indicam que o pH líquido se mostra constante e próximo àquele do sangue, na maioria das condições patológicas.

A determinação dos níveis protéicos totais líquidos, nos animais dos grupos G1, coincidiu com valores considerados normais por Fernandes (1990) ; Oliver ; Lorenz (1997). Já nos cães dos grupos G2 e G3, observou-se aumento significativo do componente protéico do LCE, como citado os casos de viroses neurológicas por vários autores tais como Sorjonem (1987), Sorjonem et al. (1989); Thomas et al. (1993); Tudury et al. (1997) ; Feitosa et al. (1997a). Segundo Bailey e Vernau (1997), nas desordens neurológicas, a elevação dos níveis protéicos líquidos se deve à produção local de imunoglobulinas, e ainda, à quebra da barreira hemato-encefálica, fatos estes comprovados, frente á cinomose, por Abate et al. (1998) e Gama (2003), respectivamente. Diferentemente dos outros parâmetros líquidos estudados neste ensaio, as proteínas líquidas mostraram diferença estatisticamente significativa nos três grupos estudados demonstrando que mesmo no G2, cujas elevações das atividades enzimáticas foram discretas e de certa forma, muito próximas àquelas dos animais controle. A elevação protéica já foi significativa e acima dos valores fisiológicos para cães, concordando com Coates (2000), o qual indica que as elevações protéicas totais são as alterações líquidas mais freqüentemente encontradas frente a desordens neurológicas e Sorjonem et al. (1989) que ressalta importância das proteínas totais líquidas para a detecção de severidade das lesões do SNC. E ainda, discorda de trabalhos anteriores como o de Wolintz et al. (1969), segundo o qual as elevações das atividades enzimáticas líquidas são mais precoces em demonstrar anormalidades do sistema nervoso central do que as proteínas totais do LCE.

Os valores encontrados para as atividades das enzimas lactato desidrogenase, aspartato aminotransferase e creatina quinase permitiram a subdivisão dos animais acometidos pela cinomose em animais com elevação discreta das atividades enzimáticas líquidas (G2) e acentuadas (G3), já que as atividades destas enzimas se comportaram de maneira similar nos animais estudados, da mesma forma que

experimentos com humanos realizados por Osuna et al. (1992); Lutsar et al. (1994). Desta forma, observou-se que apesar dos animais do G2 não apresentarem diferença estatisticamente significativa com relação aos animais do G1, seus valores médios se mostraram acima dos considerados fisiológicos por Indrieri et al. (1980); Fernandes (1990) ; Abate et al. (1998). Os animais do grupo G3, por sua vez, apresentaram diferença significativa com relação aos animais dos grupos G1 e G2 e seus valores médios ainda se encontraram mais elevados que os encontrados por Wright (1980) ; Feitosa et al. (1989) e similares aos de Gama (2003). As elevações das atividades enzimáticas de LDH, AST e CK foram atribuídas a danos do SNC em experimentos de Abate et al. (1998) ; Gama (2003), em cães com cinomose. No entanto, contaminações sanguíneas, morte de células do SNC e também quebra da integridade da barreira hemato-encefálica, têm sido apontadas como explicações para tais elevações por Abate et al. (1998) e Meinkoth e Crystal (1999). Desta forma, Lutsar et al. (1994) indicam a importância da isoenzimologia na identificação da provável causa da elevação destas enzimas e ressalta a eficiência da CK-BB em humanos.

A isoenzima creatina quinase BB líquórica mostrou atividades bem próximas daquelas encontradas para a atividade total da CK, nos três grupos estudados, sendo possível atentar para a origem neurológica desta enzima, fato também comprovado por Hans et al. (1983); Nussinovith et al. (1996), o que é possível que também tenha ocorrido com a lactato desidrogenase e a aspartato aminotransferase líquóricas, devido ao comportamento similar entre elas, concordando com achados de Osuna et al. (1992), em humanos. Além disso, foi possível observar a não interferência da atividade sérica da CK, visto que, frente a desordens neurológicas, como a cinomose, vários autores tais como Kramer ; Hoffman (1997) constataram suas elevações devido a alterações musculares esqueléticas. Desta forma, acredita-se que as atividades séricas das mesmas enzimas não são eficientes em indicar lesões cerebrais, como citado em vários trabalhos relativos ao homem. (HANS et al., 1983 e LUTSAR et al. 1994). Ainda é possível ressaltar que esta interferência não ocorre mesmo frente à quebra da barreira hemato-encefálica, a qual é freqüente na cinomose, segundo verificações de

Sorjonem et al. (1989) e Gama (2003) e cujos valores de proteínas totais são próximos aos encontrados no presente experimento.

Os achados histopatológicos não mostraram a presença de corpúsculos da cinomose em todos os animais estudados e portadores da doença, concordando com Jones et al. (2000) que citam a possibilidade da cinomose ocorrer sem o encontro destes em fragmentos histológicos. Os corpúsculos ocorreram no mesmo número de animais dos grupos G2 e do G3, como reportados nos achados de Feitosa et al. (1997) que não observaram maior quantidade destes corpúsculos nos animais com maior severidade das lesões neurológicas.

A presença de quantidade importante de manguitos perivasculares reflete intensa resposta inflamatória e suportam o diagnóstico da enfermidade viral, como a cinomose, porém a presença mais marcante nos animais do G2 discorda de afirmações de Appel (1987) e Feitosa et al (1997b), que a presença desta inflamação somente ocorre em estágios mais avançados de desmielinização. E também discorda dos mesmos autores que observaram uma correlação entre a resposta inflamatória e a concentração protéica, fato não ocorrido neste experimento.

As lesões desmielinizantes foram as alterações do sistema nervoso, mais representativas, as quais acometeram todos os animais com cinomose, sendo utilizadas então como referência de lesão estrutural neurológica. Tais lesões se mostraram de forma focal, multifocal e difusa, variando sua intensidade de leve, moderada a severa, corroborando Jones et al. (2000) que citam a possibilidade destas variações frente às desmielinizações ocasionadas na cinomose. Observou-se que os animais do G2 apresentaram uma quantidade menor de lesões de abrangência focal a multifocal, com intensidades moderadas e severas, principalmente nos fragmentos córtex, cerebelo e na região periventricular. Já os animais do G3 mostraram número maior de lesões, variando de multifocais a difusas, de intensidade moderada a severa, nos fragmentos córtex, cerebelo, região periventricular e hipocampo. Estes achados são similares àqueles encontrados por Wright (1980); Chrisman (1985); Vázquez et al. (1995); Osuna et al. (1992); Nussinovith et al. (1996); Yuko et al. (2001), os quais citam a proporção das atividades enzimáticas líquóricas de AST, LDH e CK com a extensão

dos danos estruturais, porém discordam de Feitosa et al. (1997) que não observaram uma correlação destas enzimas com a quantidade de lesões desmielinizantes, em animais com cinomose.

Os resultados encontrados para a atividade da enzima CK-BB, proporcional às lesões desmielinizantes nos grupos de animais com cinomose, também corroboram vários autores que encontraram a proporcionalidade das atividades desta enzima com achados histopatológicos do SNC em humanos com vários danos neurológicos. (HANS et al., 1983; OSUNA et al., 1992; VÁSQUEZ et al., 1995; YUKIO et al., 2001). Já com relação à cinomose, trabalhos específicos com a localização da CK-BB no sistema nervoso de cães normais, citam a hipótese de que a elevação das atividades ocorra pela presença da CK-BB em astrócitos e pelo papel destes no processo da desmielinização. (WORLEY et al., 1985; MUTINELLI et al., 1988).

Já com relação à utilização das enzimas liquóricas como indicadores de prognóstico, ressalta-se experimentos realizados em cães por Indrieri et al. (1980); Braund (1994); Gama (2003), e em humanos Lutsar et al. (1994); Yukio et al. (2001), nos quais da mesma forma que no presente experimento observaram-se óbitos relacionados com elevadas atividades de AST, LDH, CK e CK-BB, como observado nos animais do G3. No entanto, também não discorda de Lutsar et al. (1994); Coplin et al. (1999) que afirmam que as baixas atividades destas enzimas não excluem a possibilidade de prognósticos ruins, visto que, neste experimento, mesmo os animais do G2, os quais apresentaram os menores valores enzimáticos, também foram eutanasiados pelas péssimas condições clínicas dos mesmos. Os autores supracitados citam que as variações nas atividades das enzimas nos indivíduos, ainda não estão completamente entendidas, mas acreditam que estejam relacionadas com a diferente distribuição destas enzimas no sistema nervoso, como reportado por Chandler et al. (1987), como também a possibilidade de uma lesão focal em um segmento vital com mínima liberação enzimática, como mostrou Maas et al. (1977); Vaagenes et al. (1980).

## **5. CONCLUSÕES**

Os resultados obtidos no presente ensaio, analisados e interpretados à luz da fase neurológica da cinomose, permitem as seguintes conclusões.

- Características físico-químicas do liquor tais como, coloração, aspecto, densidade e pH, geralmente apreciadas ao exame laboratorial do LCR, não contribuem para indicar

qualquer alteração nas atividades das enzimas LDH, AST, CK-T e CK-BB líquóricas e lesões no sistema nervoso central de cães com cinomose.

- A determinação das concentrações protéicas totais no liquor permite uma boa correlação com as atividades das enzimas LDH, AST, CK-T e CK-BB, bem como na detecção de desordens do sistema nervoso central na fase neurológica da cinomose canina.
- A análise das atividades enzimáticas séricas de CK, LDH e AST, amplamente utilizadas no diagnóstico de distúrbios musculares, bem como a CK-BB, quando realizada no LCE é capaz de mostrar a presença de danos do sistema nervoso central, sendo suas magnitudes proporcionais à abrangência e à intensidade das lesões neurológicas na cinomose.
- As elevações acentuadas das atividades de LDH, AST, CK-T e CK-BB líquóricas podem denotar um prognóstico ruim, porém elevações discretas destas enzimas não excluem esta possibilidade em cães com cinomose.
- A atividade da enzima CK-BB representa quase a totalidade da CK-total do líquido cefalorraquidiano nos cães.
- A análise da isoenzima CK-BB não mostrou vantagens na detecção de anormalidades do sistema nervoso central quando comparada com as atividades da CK-T, nem mesmo das outras enzimas líquóricas LDH e AST frente à cinomose.

## 6. REFERÊNCIAS

ABATE, O; BOLLO, E; LOTTI, D; BO, S. Cytological Immunocytochemical and Biochemical Cerebrospinal Fluid Investigations in Selected Central Nervous System Disorders of Dogs. **Journal of Veterinary Medicine**, v. 45, p. 73-85, feb. 1998.

ALLEMAN, A.R. et al. Identification of Intracytoplasmatic Inclusion Bodies in Mononuclear Cells from the Cerebrospinal Fluid of a Dog with Canine Distemper. **Veterinary Pathology**, v. 29, p. 84-85, jan. 1992.

BAILEY, C.S; HIGGINS, R.J. Comparison of total white blood cell count and total protein content of lumbar and cisternal cerebrospinal fluid of health dogs. **American Journal of Veterinary Research**, v. 46, n. 05, p.1162-1165, may. 1985.

BAKAY, A.E. et al. Enzymatic changes in serum and cerebrospinal fluid in neurological injury. **Journal of Neurosurgery**, v. 58, p. 27-37, jan. 1983.

BRAUND, K.G. Diagnostic Techniques, In:\_\_\_\_\_, K.G. **Clinical Syndromes in Veterinary Neurology**. St Louis: Mosby, 1994, p. 333-421.

BAILEY, C.S; VERNAU, W. Cerebrospinal Fluid. In: KANEKO, J.J. **Clinical Biochemistry of Domestic Animals**. 5ed. San Diego: Academic Press, 1997. p. 786-827.

BODVARSSON, A; FRANZSON, L; BRIEM, H. Creatine kinase isoenzima BB in the cerebrospinal fluid of patients with acute neurological diseases. **Journal of Internal Medicine**, v.227, p. 5-9, jun. 1990.

CARDINET, G.H. Skeletal Muscle Function, In: In: KANEKO, J.J. **Clinical Biochemistry of Domestic Animals**. 5ed. San Diego: Academic Press, 1997. p. 407-440.

CHANDLER, W.L. et al. Creatine Kinase Isoenzymes in Human Cerebrospinal Fluid and Brain. **Clinical Chemistry**, v. 30, n. 11, p. 1804-1806, aug. 1984.

CHRISMAN, C.L. Investigações Auxiliares Especiais, In:\_\_\_\_\_. **Neurologia dos Pequenos Animais**. São Paulo: Roca, 1985, p. 63-96.

COATES, JR. Cerebrospinal Proteins, In: FELDMAN, BF, ZINKL, JG, JAIN, NC, **Schalm's Veterinary Hematology**. 5th ed. Philadelphia:Lippincott Williams & Wilkins, 2000, p. 917-924.

COLES, E.H. Cerebrospinal Fluid, In:\_\_\_\_\_. **Veterinary Clinical Pathology**. Canadá: W. B. Saunder, 1986, p. 267-278.

COOK, J.R; DENICOLA, D.B. Cerebrospinal Fluid. **Veterinary Clinics of North America Small Animal Practice**, v. 18, n. 3, p. 475-497, may. 1988.

COPLIN, W.M. et al. Cerebrospinal Fluid Creatine Kinase-BB Isoenzyme Activity and Outcome After Subarachnoid Hemorrhage. **Arquivos of Neurology**, v.56, p. 1348-1352, nov. 1999.

DeLAHUNTA, A. Inflammatory diseases of the central nervous system, In:DeLAHUNTA, A. **Veterinary Neuropatology**. 2. ed. Philadelphia: W.B.Saunders, 1983, p. 261.

EISEN, A.A; SHERWIN, A.L. Serum creatine phosphokinase activity in cerebral infaction. **Neurology**, v.18, p. 263-268, mar. 1968.

FEITOSA, M.M. et al. Avaliação física, citológica, conteúdo de proteínas e determinação qualitativa de globulinas do liquor de cães com encefalite por cinomose. **Brazilian Journal of Veterinary Research of Animal Science**, v. 34,n. 03, p. 147-151, jul. 1997a.

FEITOSA, M.M; LUVIZOTTO, M.C.R; FEITOSA. F.L.F. Alterações do liquor de cães com encefalite por cinomose e suas correlações com as alterações anatomopatológicas do sistema nervoso central. **Ars Veterinaria**. V.13, n.01, p.6-16, jan. 1997b.

FENNER, W.R. Moléstias do Cérebro, In: ETTINGER, S.J; FELDMAN, E.C. **Tratado de Medicina Interna Veterinária**. 4. ed. São Paulo: Manole, 1995. v. 1 p. 819-879.

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, apr. 1990.

GAMA, F.G.V. Proteinograma e Caracteres Físico-Químicos e Citológicos no Líquor de Cães com Cinomose. 2003. 50f. **Dissertação** (Mestrado em Clínica Médica) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal.

GAMA, F.G.V; NISHIMORI, C.T; 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, mai-jun. 2005.

GUIU, J.M. et al. Myelin Basic Protein and Creatine Kinase BB Isoenzyme as CSF markers of Intracranial tumors and Stroke. **Acta Neurologica Scandinavia**. v. 73, p. 461-465, dec. 1986.

HANS, P. et al. Improved outcome prediction based on CSF extrapolated creatine kinase BB isoenzyme activity and other risk factors in severe head injury. **Journal of Neurosurgery**. v. 71, P. 54-58, jul. 1989.

HANS, P. et al. Creatine Kinase isoenzymes in severe head injury. **Journal of Neurosurgery**. v. 58, p. 689-692, may. 1983.

HURTT, A.E; SMITH, O.S. Effects of iatrogenic blood contamination on results of cerebrospinal fluid analysis in clinically normal dogs and dogs with neurologic disease.

**Journal of American Veterinary Medical Association**, v. 211, n. 07, p. 866-867, oct. 1997.

INDRIERI, R.J; HOLLIDAY, T.A; KEEN, C.L. Critical Evaluation of Creatine Phosphokinase in Cerebrospinal Fluid of Dogs with Neurologic Disease. **American Journal of Veterinary Research**, v. 41, n. 08, p. 1299-1303, aug. 1980.

INGEBRIGTSEN, T., ROMNER, B. Biochemical Serum Markers of Traumatic Brain Injury. **The Journal of Trauma**. v. 53, n. 04, p.798-808, apr. 2002.

JONES, T.C; HUNT, R.D; KING, M.W. Moléstias Causadas por agentes virais. In:\_\_\_\_\_. Patologia Veterinária. Manole: São Paulo, 2000. p.205-380.

KJEDELDSBERG, C.A., KNIGHT, J.A. Cerebrospinal Fluid. In:\_\_\_\_\_ **Body Fluids**. Chicago: ASCP Press, 1992. p.65-157.

KÄRKELÄ, J., BOCK, E., KAUKINEN, S. CSF and serum brain-specific creatine kinase isoenzyme (CK-BB), neuron-specific enolase (NSE) and neural cell adhesion molecule (NCAM) as prognostic markers for hypoxic brain injury after cardiac arrest in man. **Journal of Neurological Sciences**, v. 116, p. 100-109, nov. 1993.

KAY, W.J; ISRAEL, E; PRATA, R.G. Cerebrospinal Fluid. **Veterinary Clinics of North America**, v. 04, n. 02 p. 419-35, may. 1974.

KRAMER, J.W., HOFFMANN, W. Clinical Enzymology. In:KANEKO. **Clinical Biochemistry of Domestic Animals**. 5ed.San Diego: Academic Press, 1997. p. 303-325.

LASSEN, E.D. Laboratory Detection of Muscle Injury. In: THRALL, MA. *Veterinary Hematology and Clinical Chemistry*. Baltimore: Lippincott Williams & Wilkins, 2004. p.417-420.

LUTSAR, I. et al. Enzymatic changes in the cerebrospinal fluid in patients with infections of the central nervous system. **Acta Paediatrica**, v. 83, p. 1146-50, may. 1994.

MAAS, I.R.A. Cerebrospinal fluid enzymes in acute brain injury. 1. Dynamics of changes in CSF enzyme after experimental brain injury. **Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry**, v. 44, p. 655-665, feb. 1977a.

MAAS, I.R.A. Cerebrospinal fluid enzymes in acute brain injury. 2. Relation of CSF enzyme activity to extent of brain injury. **Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry**, v. 44, p. 666-675, feb. 1977b.

MAYHEW, I.G; BEAL, C.R. Techniques of Analysis of Cerebrospinal Fluid. **Veterinary Clinics of North America Small Animal Practice**, v. 10, n. 1, p. 155-177, feb. 1980.

MCGUIRK, S.M; MACWILLIAMS, P.S. Cerebrospinal fluid, In: COWELL e TYLER, **Cytology and Hematology of the Horse**. 1. ed. California: American veterinary Publications, 1992, p.163-171.

MEINKOTH, J.H; CRYSTAL, M.A Cerebrospinal Fluid Analysis, In: In: COWELL, R.L; TYLER, R.D; MEINKOTH, J.H, **Cytology and Hematology of the Horse**. 2. ed. Philadelphia: Mosby, 1999, p.125-141

MUTINELLI, F; VANDEVELD, M., RICHARD, A. Astrocytic infection in canine distemper virus-induced demyelination. **Acta Neuropathologica**, v, 77, p. 333-335, jul. 1988.

NUSSINOVITCH, M. et al. Increased Creatine Kinase Brain Isoenzyme Concentration in Cerebrospinal Fluid with Meningitis. **Clinical Pediatrics**, v. 40, p. 349-351, jul. 1996.

OLIVER, J.E; LORENZ, M.D. Confirming a Diagnosis, In: OLIVER, J.E., LORENZ, M.D. **Handbook of Veterinary Neurology**. 2ed. Philadelphia: W B Saunders Company, 1997. p. 90-104.

OSUNA, E. et al. Efficacy of cerebrospinal fluid biochemistry in the diagnosis of brain insult. **Forensic Science International**. v. 52, p.193-198, nov. 1992.

SHERWIN, A. L; NORRIS, J.W; BULCKE, J.A. Spinal fluid creatine kinase in neurologic disease. **Neurology**. V. 19, p. 993-999, oct. 1969.

SORJONEM, D.C. Total protein, albumin quota, and electrophoretic patterns in cerebrospinal fluid of dogs with central nervous system disorders. **American Journal of Veterinary Research**, v. 48,n. 2, p. 301-305, feb. 1987.

THOMAS, W.B; SORJONEM, D.C; STEISS, J.E. A retrospective Evaluation of 38 Cases of Canine Distemper Encephalomyelitis. **Journal of the American Animal Hospital Association**, v. 29, p. 129-33, mar. 1993.

TIRSCHWELL, D.L. et al. Cerebrospinal fluid creatine kinase BB isoenzyme activity and neurologic prognosis after cardiac arrest. **Neurology**, v. 48, p. 352-357, jun. 1997.

TUDURY, E.A. et al. Observações Clínicas e Laboratoriais em Cães com Cinomose Nervosa. **Ciência Rural**, v. 27,n. 2, p. 229-235, dec. 1997.

VAAGENES, P., KJEKSHUS, J.,TORVIK, A. The Relationship Between Cerebrospinal Fluid Creatine Kinase and Morphologic Changes in the Brain After Transient Cardiac Arrest. **Circulation**, v.61, n.6, p.1194-1199, nov. 1980.

VÁZQUEZ, F. et al. Creatine Kinase BB and Neuron-Specific Enolase in Cerebrospinal Fluid in the Diagnostic of Brain Insult. **The American Journal of Forensic and Pathology**, v. 16, n. 03, p. 210-214, sep. 1995.

WOLINTZ, A.H. et al. Serum and Cerebrospinal Fluid Enzymes in Cerebrospinal Disease. **Archives Neurology**. v. 20, p. 54-61, jan, 1969.

WORLEY, G. et al. Creatine Kinase Isoenzyme: Relationship of Cerebrospinal Fluid Concentration to the Neurologic Condition of Newborns and Cellular Localization in the Human Brain. **Pediatrics**. v.76, n.1. p. 15-21, jul. 1985.

WRIGHT, J.A. Evaluation of cerebrospinal fluid in the dog. **Veterinary Record**, v. 103, p. 48-51, jul. 1978.

WRIGHT, J.A. Cerebrospinal fluid enzyme estimation in the diagnosis of central nervous system damage in the dog. **Veterinary Record**, v. 106, p. 54-57, jan. 1980.

YUKIO, I. et al. Biochemical Markers for Brain Damage. **Neurosurgery Quarter**, v. 11, n. 03, p. 173-180, sep. 2001.

\* Regidas conforme as normas da ABNT – NBR 6023, agosto/2002.