



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

---

CRISTIANE OLIVEIRA CAETANO

**USO DA GFAP COMO BIOMARCADOR EM CÃES COM E  
SEM SINAIS NEUROLÓGICOS CENTRAIS**

---

Londrina  
2018

**CRISTIANE OLIVEIRA CAETANO**

**USO DA GFAP COMO BIOMARCADOR EM CÃES COM E  
SEM SINAIS NEUROLÓGICOS CENTRAIS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Universidade Estadual de Londrina como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Lucas Alécio Gomes

Londrina  
2018

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

Caetano, Cristiane Oliveira Caetano.

Uso da GFAP como biomarcador em cães com e sem sinais neurológicos centrais / Cristiane Oliveira Caetano Caetano. - Londrina, 2018.  
47 f. : il.

Orientador: Prof. Dr. Lucas Alécio Gomes Gomes.

Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, 2018.  
Inclui bibliografia.

1. Animal - Tese. 2. Encéfalo - Tese. 3. Lesão - Tese. 4. Proteína - Tese. I. Gomes, Prof. Dr. Lucas Alécio Gomes. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal. III. Título.

CRISTIANE OLIVEIRA CAETANO

**USO DA GFAP COMO BIOMARCADOR EM CÃES COM E SEM  
SINAIS NEUROLÓGICOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Universidade Estadual de Londrina como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Orientador: Prof. Dr. Lucas Alécio Gomes  
Universidade Estadual de Londrina – UEL

---

Prof. Dr. Alexandre Mendes Amude  
Universidade de Cuiabá – UNIC

---

Profa. Dra. Mônica Vicky Bahr Arias  
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Londrina, 29 de outubro de 2018.

Dedico este trabalho primeiramente a Deus, que me deu sabedoria, forças e perseverança em todas as circunstâncias, à minha mãe, que me apoiou incondicionalmente desde o início na minha formação acadêmica, e ao meu esposo e minha filha, amores da minha vida.

## AGRADECIMENTOS

É difícil agradecer a todos que me ajudaram a concluir este trabalho em apenas algumas linhas, mas iniciarei agradecendo a Deus, que me planejou e criou, me deu uma nova vida em Cristo Jesus, me trouxe a alegria e a paz que só Ele dá. Deus despertou em meu coração o amor e respeito pelos animais de forma peculiar desde minha infância e posteriormente o desejo de me tornar Médica Veterinária e Docente da área. Ele esteve comigo em todos os momentos, sendo minha rocha e meu alicerce em momentos de luta, choro, vitórias e risos. Ele me fortaleceu quando me senti fraca, me abraçou quando me senti sozinha, me ensinou a esperar e a descansar em seus braços de amor vivendo em sua dependência. Deus me deu uma família linda que amo tanto, cachorros e gatos amorosos que me inspiraram e amigos tão chegados como irmãos pra caminharem comigo. Obrigada Deus por mais essa grande conquista.

À minha mãe, Raquel, que me amou antes mesmo de me conhecer, me apoiou nos meus estudos mesmo diante de grandes obstáculos e dificuldades. Me deu o seu melhor, me ensinou a andar nos caminhos do Senhor e me corrigiu sempre que precisei, me ajudando a me tornar quem sou hoje. Obrigada por cada oração realizada por mim mãe, por cada demonstração de cuidado e carinho comigo, e por cada palavra de motivação a continuar estudando.

Ao meu esposo, Marcus, quem tanto amo e me ajudou muito na execução deste trabalho. Você meu amor tornou meus dias muito melhores e felizes. Você sempre me alegrou com seu amor e seu jeito carinhoso e engraçado, me deu apoio nas horas mais difíceis, me tranquilizando nos momentos de aflição e me fazendo rir muitas vezes quando na verdade eu queria chorar. Você me impulsionou a seguir em frente com meu desejo de ser pesquisadora e contruir uma carreira docente com alegria e zelo, e ainda na conclusão deste trabalho me deu meu maior presente: nossa filha! Amo muito vocês.

À minha querida filha, Maria Júlia, razão do meu viver e inspiração para o meu dia-a-dia. Te amo muito filha.

À toda a minha família que me amo muito, em especial minhas irmãs Rejiane e Dayane pelo amor de vocês e orações por mim. Ao meus sogros Margareth e Hideraldo, cunhadas Ana Paula e Maria Fernanda e cunhado Paulo pelo carinho e estímulo a realizar este trabalho.

Aos meus animais queridos, especialmente à Nicolly (*in memorian*) que sempre foi minha parceira de estudos, sempre me fazendo companhia e me amando incondicionalmente por tantos anos. Aos meus cachorros Nino (*in memorian*), Ânnea (*in memorian*) e Maya, e ao meu gato Farofa, que amo muito e colaboraram muito para meu bem estar e dedicação aos estudos.

Ao meu professor orientador, Prof. Dr. Lucas A. Gomes, não só pela orientação na execução deste trabalho, como por sua amizade. Agradeço a cada conselho dado, cada caso clínico discutido, cada conhecimento passado. O Sr me inspirou a ser docente com amor pela docência, com apreço por cada paciente, cada aluno, cada aula, cada colega de profissão. Além de conhecimento teórico, o Sr passa aos seus alunos experiências de vida e o exemplo de ser uma pessoa simples e sábia. Desde a graduação, depois durante a residência, seus ensinamentos ficaram gravados em minha memória para que posteriormente eu também possa repassar parte do que aprendi aos meus futuros alunos. Posso dizer que me sinto privilegiada por fazer parte do seu legado professor, e que espero um dia passar adiante o conhecimento adquirido com o senhor.

Aos professores, residentes, enfermeiros e demais funcionários do Hospital Veterinário (HV-UEL), especialmente do setor de Clínica Médica de Animais de Companhia, laboratórios de Patologia Clínica, Anatomia Patológica, Parasitologia, Protozoologia e Virologia.

Aos meus amigos que são muito importantes em minha vida, especialmente: Carolina Sebrian, Mércia, Gabriela Milani, Carolina Santos, Larissa, valdair, Marcelo, Raíra, Gabriela Alves, Luci, Arthur, Marcli, Mariele, e tantos outros amigos que Deus me presenteou. Meu muito obrigada queridos!

Aos demais colegas de profissão que me auxiliaram direta ou indiretamente com este trabalho.

Aos professores doutores membros da banca avaliadora, por disponibilizarem tempo e dedicação nas correções do trabalho e contribuir para o aprimoramento da dissertação. Meu muito obrigada!

**“Não temas, porque estou contigo; não fique  
ansioso, porque eu sou o teu Deus; eu te fortaleço,  
te ajudo e te sustento com a destra da minha  
justiça.”  
Isaías 41:10**

CAETANO, Cristiane Oliveira. **Uso da GFAP como biomarcador em cães com e sem sinais neurológicos centrais**. 2018. 47 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2018.

## RESUMO

Encefalite por definição é qualquer afecção que resulte em inflamação e lesão tecidual com alteração estrutural ou funcional do encéfalo. O diagnóstico da causa da encefalite usualmente inclui exames laboratoriais, análise de líquido cefalorraquiano (LCE) e exames de imagem avançada, porém, nem sempre esses métodos diagnósticos estão disponíveis ou em alguns casos há contraindicações para a realização dos referidos exames. Uma alternativa para se obter o diagnóstico de lesão encefálica é a utilização de biomarcadores, que vem sendo amplamente estudados na medicina humana e são mensurados em fluidos corporais como soro, plasma e LCE. A mensuração de um biomarcador específico de lesão neuronal, de forma simples, rápida e minimamente invasiva traz muitos benefícios ao paciente. Em humanos a proteína fibrilar glial ácida (GFAP) é liberada exclusivamente na presença de lesão encefálica e está correlacionada com mau prognóstico e recuperação tardia dos pacientes, sendo provavelmente uma boa opção como biomarcador em cães. Na Medicina Veterinária há poucos estudos sobre biomarcadores de lesão neuronal, e ainda não há dados consistentes sobre a expressão da proteína em cães com encefalite e a mensuração desta em fluidos corporais como soro e LCE. Assim sendo, o objetivo geral deste trabalho é comparar os níveis de GFAP no soro de cães com e sem encefalite e no LCE de alguns cães com encefalite. O estudo avaliou 31 cães, sendo 21 cães doentes com sinais clínicos de encefalite ou meningoencefalite (Grupo Doente – GD) e 10 cães saudáveis sem sinais clínicos de doença e exames laboratoriais dentro dos intervalos de referência (Grupo Controle – GC). O intervalo de inclusão dos animais neste estudo foi de outubro de 2016 a junho de 2017. Neste estudo um aumento da GFAP no soro de 6/21 cães do GD foi observado, enquanto que no GC nenhum animal apresentou níveis séricos elevados acima do ponto de corte. A média do biomarcador no soro de animais do GD foi de 2,49 ng/ml, no LCE foi de 33,07 ng/ml, e no soro dos cães do GC foi de 0,11 ng/ml. A análise estatística não paramétrica Kruskal Wallis não conseguiu explicar os resultados do estudo, devido ao grande número de resultados igual a zero do GD e à heterogeneidade dos dados. Considera-se a estatística descritiva para a conclusão deste trabalho. Assim sendo, pondera-se que o GD obteve média superior ao GC na mensuração da GFAP no soro. Foi possível verificar que animais com encefalite apresentam elevações séricas de GFAP após cinco dias de lesão encefálica, que o biomarcador apresentou uma alta especificidade e que animais saudáveis não apresentam níveis detectáveis do biomarcador no soro. O estudo também sugere uma maior sensibilidade do LCE para a realização do teste e que o kit ELISA utilizado no estudo obteve uma boa eficácia para uso em cães.

**Palavras-chave:** Animal. Encéfalo. Cérebro. Lesão. Proteína.

CAETANO, Cristiane Oliveira. **Use of GFAP as biomarker in in dogs with and without central neurological signs**. 2018. 47 p. Dissertation (Master's Degree in Animal Science) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2018.

## ABSTRACT

Encephalitis by definition is any condition that results in inflammation and tissue damage with structural or functional alteration of the encephalon. Diagnosis of the cause of encephalitis usually includes laboratory tests, cerebrospinal fluid (CSF) analysis and advanced imaging tests; however, these diagnostic methods are not always available or in some cases there are contraindications to these tests. An alternative to the diagnosis of brain injury is the use of biomarkers, which have been widely studied in human medicine and are measured in body fluids such as serum, plasma and CSF. Measurement of a specific neuronal lesion biomarker in a simple, fast and minimally invasive manner brings many benefits to the patient. In humans the glial fibrillary acidic protein (GFAP) is released exclusively in the presence of brain injury and is correlated with poor prognosis and late recovery of the patients, probably being a good option as a biomarker in dogs. In Veterinary Medicine there are few studies on neuronal lesion biomarkers, and there is still no consistent data on the expression of the GFAP protein in dogs with encephalitis and the measurement of this in body fluids such as serum and CSF. Therefore, the general objective of this study is to compare the levels of GFAP in the serum of dogs with and without encephalitis and in the CSF of some dogs with encephalitis. The study evaluated 31 dogs, 21 dogs with clinical signs of encephalitis or meningoencephalitis (Sick Group - SG) and 10 healthy dogs with no clinical signs of disease and results of laboratory tests within the reference range (Control Group - CG). The inclusion interval of the animals in this study was from October 2016 to June 2017. In this study an increase of GFAP in the serum of 6/21 SG dogs was observed, whereas in CG no animal had elevated serum levels above the cutoff point. The mean of the biomarker in the serum of SG animals was 2.49 ng / ml, in the CSF it was 33.07 ng / ml, and the serum of the CG dogs was 0.11 ng / ml. The nonparametric statistical analysis Kruskal Wallis failed to explain the results of the study, due to the large number of results equal to zero of the SG and the heterogeneity of the data. We consider the descriptive statistics for the conclusion of this work. Therefore, it is considered that the SG obtained a mean higher than the CG in the measurement of serum GFAP. It was possible to verify that animals with encephalitis show serum elevations of GFAP after five days of brain injury, that the biomarker presented a high specificity and that healthy animals did not present detectable levels of the biomarker in the serum. The study also suggests a greater sensitivity of the CSF for the test and that the ELISA kit used in the study obtained a good efficacy for use in dogs.

**Keywords:** Animal. Brain. Encephalon. Lesion. Protein.

## LISTA DE QUADROS

- Quadro 1** – Principais agentes infecciosos conhecidos por causar meningoencefalites em cães e gatos na América do Sul..... 19
- Quadro 2** – Aspectos normais do LCE e valores de referência ..... 22

### **ARTIGO CIENTÍFICO: USO DA GFAP COMO BIOMARCADOR EM CÃES COM E SEM SINAIS NEUROLÓGICOS CENTRAIS**

- Quadro 1** – Raça, peso, idade e valores séricos de GFAP nos cães do grupo controle (GC) ..... 33
- Quadro 2** – Aspectos clínicos e concentrações séricas de GFAP em cães do grupo doente (GD) ..... 35
- Quadro 3** – Análise de 6 amostras de LCE de cães com encefalite atendidos no HV-UEL entre 2016 e 2017 ..... 35
- Quadro 4** – Concentrações de GFAP no soro e no LCE de 7 cães com encefalite atendidos em um hospital escola em Londrina, 2017 ..... 36

## LISTA DE GRÁFICOS

### ARTIGO CIENTÍFICO: USO DA GFAP COMO BIOMARCADOR EM CÃES COM E SEM SINAIS NEUROLÓGICOS CENTRAIS

- Gráfico 1** – Concentrações séricas de GFAP de 21 cães com encefalopatias (Grupo Doente) e 10 cães hígidos (Grupo Controle)..... 34
- Gráfico 2** – Valores de GFAP sérica em 21 cães com encefalite em relação ao tempo de evolução dos sinais clínicos de lesão encefálica ..... 34

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ALT	Alanina Aminotransferase
CDV	Vírus da Cinomose Canina
CK	Creatina Quinase
DDIV	Doença do Disco Intervertebral
DO	Densidade Óptica
ELISA	Ensaio de Imunoabsorção Enzimática (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay)
FA	Fosfatase Alcalina
FC	Frequência Cardíaca
FR	Frequência Respiratória
GC	Grupo Controle
GE	Grupo Encefalite
GFAP	Proteína Fibrilar Glial Ácida
GOD	Globo ocular direito
GOE	Globo ocular esquerdo
HV	Hospital Veterinário
HV-UEL	Hospital Veterinário da Universidade Estadual de Londrina
LCE	Líquido Cerebrospinal
LES	Lúpus Eritematoso Sistêmico
MEG	Meningoencefalite Granulomatosa
MEM	Meningoencefalomielite
NM	Não Mensurado
NSE	Enolase Neuronal Específica
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PCR-AESP	Parada Cardio-Respiratória em Atividade Elétrica sem Pulso
PIC	Pressão Intracraniana
PT	Proteínas Totais
RG-HV	Registro Geral do Hospital Veterinário
RM	Ressonância Magnética
RT-PCR	Reação da Transcriptase Reversa seguida de Reação em Cadeia da Polimerase
RX	Raio X
SNC	Sistema Nervoso Central
SNP	Sistema Nervoso Periférico
TC	Tomografia Computadorizada
T°C	Temperatura Corporal (grau Celsius)
TPC	Tempo de Preenchimento Capilar
UEL	Universidade Estadual de Londrina
UPC	Relação Proteína/Creatinina Urinária

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	14
<b>2</b>	<b>REFERENCIAL TEÓRICO</b> .....	16
2.1	ENCEFALITE.....	16
2.1.1	Sinais Clínicos, Exame Neurológico e Localização da Lesão .....	17
2.1.2	Etiologia, Diagnósticos Diferenciais e Prognóstico das Encefalites.....	17
2.1.3	Diagnóstico.....	20
2.1.3.1	Exames de triagem do paciente neurológico.....	20
2.2	BIOMARCADORES .....	23
2.2.1	BIOMARCADORES DE LESÃO ENCEFÁLICA .....	24
2.2.2	PROTEÍNA FIBRILAR GLIAL ÁCIDA – GFAP .....	24
2.2.3	AMOSTRAS BIOLÓGICAS PARA A MENSURAÇÃO DA GFAP POR ENSAIO ENZIMÁTICO E SUA APLICABILIDADE NA MEDICINA VETERINÁRIA .....	27
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	29
3.1	OBJETIVO GERAL.....	29
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	29
<b>4</b>	<b>ARTIGO: USO DA GFAP COMO BIOMARCADOR EM CÃES COM E SEM SINAIS NEUROLÓGICOS CENTRAIS</b> .....	30
	ABSTRACT .....	30
	RESUMO .....	30
	INTRODUÇÃO.....	30
	MATERIAL E MÉTODOS.....	31
	RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	32
	CONCLUSÃO.....	36
	REFERÊNCIAS .....	37
<b>5</b>	<b>CONCLUSÃO</b> .....	39
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	40

<b>APÊNDICE</b> .....	44
APÊNDICE A .....	45
ANEXO .....	46
ANEXO A .....	47

## 1 INTRODUÇÃO

Anatomicamente o Sistema Nervoso Central (SNC) é formado pelo encéfalo (cérebro, cerebelo e tronco encefálico) e medula espinhal (PRADA, 2015). Alterações no SNC de cães refletem sinais clínicos diferentes do que ocorre em humanos devido às diferenças na função do encéfalo entre as espécies (NETO, 2015). Encefalite é a inflamação e lesão tecidual com alteração estrutural ou funcional do encéfalo que pode ser causada por afecções virais, fúngicas, bacterianas, inflamatórias, vasculares, traumáticas e etc. (DAMIANI et al., 2013). A lesão pode ser focal, multifocal ou difusa e a manifestação clínica de doença intracraniana depende da região do encéfalo acometida (FERNÁNDEZ; BERNARDINI, 2010; TAYLOR, 2015).

Na avaliação clínica de cães com doenças neurológicas centrais, usualmente há indicação para realização de exames de imagem avançada, porém, alguns fatores são limitantes, como a indisponibilidade do equipamento fora de grandes centros e alto custo dos exames. Outro recurso muito utilizado na avaliação de cães com encefalite é a análise de líquido cefalorraquidiano (LCE), porém, nesse caso um dos fatores limitantes de maior importância é a condição clínica do paciente, uma vez que para o procedimento há necessidade de anestesia geral (NISHIDA et al., 2014; ELIAS, 2016)

Em pacientes com afecções neurológicas é importante avaliar a extensão da lesão para que o prognóstico e tratamento sejam estabelecidos. Vários biomarcadores específicos do SNC já estão sendo utilizados na Medicina Humana, pois podem ser mensurados nos fluidos corporais e auxiliar neste processo, além de permitir a monitorização da evolução da doença de forma pouco invasiva, principalmente em pacientes críticos (RECH et al., 2006; ELIAS, 2016).

Uma preocupação dos pesquisadores é que alguns biomarcadores, a exemplo da proteína S-100 $\beta$  e da Enolase Neuronal Específica (NSE) podem estar presentes na corrente sanguínea independentemente de lesão neuronal, fator este que poderia interferir nos resultados quando se busca avaliar lesão neuronal (LEI et al., 2015).

Lei et al., em 2015, pesquisaram a Proteína Fibrilar Glial Ácida (GFAP) em pacientes humanos com lesões cerebrais traumáticas graves e relatam possível superioridade deste exame frente a demais biomarcadores, devido à sua especificidade para o tecido neuronal. A GFAP é liberada em fluidos corporais na presença de morte de astrócitos, não sendo assim rotineiramente encontrada na circulação periférica de pacientes saudáveis, o que a torna aparentemente mais fidedigna para diagnosticar lesão cerebral e determinar o prognóstico (LEI et al., 2015).

Os dados sobre o uso da GFAP na Medicina Veterinária, sobre a expressão da proteína em cães com encefalopatias e a mensuração desta em fluidos corporais são escassos. Assim como em humanos, a proteína parece ser boa candidata a biomarcador de lesão no SNC de cães. Assim sendo, o objetivo geral deste trabalho foi testar a Proteína Fibrilar Glial Ácida no soro e LCE de cães com sinais neurológicos centrais e no soro de cães saudáveis (sem sinais clínicos de doença).

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

A literatura utilizada será apresentada em forma de tópicos para melhor adequação dos assuntos abordados.

### 2.1 ENCEFALITE

O sistema nervoso do cão é dividido em duas grandes áreas: Sistema Nervoso Central (SNC), constituído pelo encéfalo (mesencéfalo, ponte, bulbo e cerebelo) e medula espinhal, e Sistema Nervoso Periférico (SNP), constituído... (ANDRADE NETO, 2015a; PRADA, 2015). Das lesões que podem ocorrer no SNC de todas as espécies de animais, as inflamatórias são importantes causas de sinais neurológicos nos animais (TIPOLD, 2009). A inflamação pode ser consequência de doenças infecciosas ou representar um processo autoimune. Muitas vezes os resultados da avaliação neurológica de pacientes com doença inflamatória do SNC são pouco específicos, a inflamação afeta medula e encéfalo simultaneamente em sua maioria, produzindo sinais de uma doença multifocal (meningoencefalites ou meningoencefalomielites) com sinais clínicos semelhantes, dificultando o diagnóstico (HIGGINBOTHAM; KENT; GLASS, 2007; ANDRADE NETO, 2015a). Devido à apresentação aguda e progressiva típica da meningoencefalite ou meningoencefalomielite, geralmente os pacientes chegam ao setor de emergência instáveis e muitas vezes em condição grave (SCHATZBERG; NGHIEM, 2012).

Em quadros de lesões corticais os sinais podem variar entre delírio, excitação, sonolência, desatenção, crises epiléticas e comportamento compulsivo (TAYLOR, 2015). Se a lesão ocorre em região de tronco encefálico, sinais como depressão acentuada são observados. Outros achados clínicos incluem: letargia, nistagmo, tremores, atrofia muscular, demência, perda de memória, e déficits de nervos cranianos (DAMIANI et al., 2013; TAYLOR, 2015).

Em relação à classificação da encefalite, também há de se considerar eventualmente estruturas que poderão estar acometidas pelo processo inflamatório, ou seja, meningite (apenas as meninges), mielite (medula espinhal), meningoencefalite (medula espinhal e encéfalo simultaneamente) e meningoencefalomielite (meninges, encéfalo e medula espinhal) (DE LAHUNTA, 2009; RADAELLI; PLATT, 2002; MAIORKA, 2015).

A meningoencefalomielite (MEM) deve fazer parte da lista de diagnósticos diferenciais quando há sinais compatíveis com encefalite (RADAELLI; PLATT, 2002). Animais com MEM geralmente apresentam a doença de forma aguda e progressiva com sinais de lesão focal ou multifocal. A inflamação ocorre nas meninges e parênquima neuronal (prosencefalo, tronco encefálico, cerebelo e/ou medula espinhal) (SCHATZBERG; NGHIEM, 2012).

### 2.1.1 Sinais Clínicos, Exame Neurológico e Localização da Lesão

O exame clínico no paciente com doença neurológica inclui investigação com dados de resenha e anamnese, exame físico geral, exame neurológico completo e procedimentos e exames complementares conforme a necessidade clínica (DE LAHUNTA, 1983).

O início, a evolução e o curso da doença são de extrema importância para auxiliar a traçar os diagnósticos diferenciais específicos. Após uma anamnese cuidadosa, o início e a evolução da doença devem ser estabelecidos como hiperagudo ou agudo (início por minutos a horas), subagudo (início ao longo de dias), crônico (início em vários dias, semanas ou meses) ou episódico (o animal retorna ao estado normal entre os episódios) (SCHATZBERG; NGHIEM, 2012).

Por meio do exame neurológico pode-se confirmar a presença de lesões no SNC e a localização da lesão, a fim de se obter o diagnóstico anatômico. O exame neurológico é realizado com as seguintes observações: estado mental/comportamento, marcha, reações posturais, nervos espinhais e reflexos medulares, nervos cranianos, tônus muscular e análise sensorial (DE LAHUNTA, 2009; NETO, 2015c).

Uma vez localizada a lesão, o Médico Veterinário pode associar as informações do diagnóstico anatômico aos dados de resenha, histórico clínico e à evolução da doença, instituir uma lista de diagnósticos diferenciais para então estabelecer um plano diagnóstico apropriado (DE LAHUNTA, 2009; ANDRADE NETO, 2015c).

### 2.1.2 Etiologia, Diagnósticos Diferenciais e Prognóstico das Encefalites

As etiologias das encefalites podem ser de origem infecciosa (viral, bacteriana, fúngica, por protozoários, parasitária e por Rickettsias), inflamatória não infecciosa (idiopática, imunomediada e autoimune), degenerativas, neoplásicas, nutricionais, traumáticas e vasculares (DE LAHUNTA, 1983; MAIORKA, 2015; ANDRADE NETO, 2015a).

Doenças inflamatórias não infecciosas são comuns no cão, e pode-se citar as imunomediadas e as auto-imune [meningoencefalite granulomatosa (MEG), meningoencefalite necrozante, leucoencefalite necrosante, meningite-arterite responsiva ao corticoide, entre outras], sem predileção por sexo e mais comuns em animais adultos jovens e de meia-idade (SCHATZBERG; NGHIEM, 2012; ANDRADE NETO, 2015a).

As meningoencefalites infecciosas são causadas por diversos agentes infecciosos e ocorrem em todo o mundo, porém são mais prevalentes em algumas localizações geográficas. Na América do Sul, os vírus da cinomose canina (CDV) e da raiva, fungos como *Criptococcus neoformans*, protozoários como o *Toxoplasma gondii* e *Neospora caninum* e rickettsias como a *R. rickettsii* são encontrados como agentes mais comuns em cães com meningoencefalite infecciosa (SCHATZBERG; NGHIEM, 2012). As causas infecciosas são mais comuns em animais jovens, porém podem ocorrer em animais idosos (ANDRADE NETO, 2015a; TAYLOR, 2015). O prognóstico da meningoencefalite de origem infecciosa depende da etiologia, duração, evolução e gravidade dos sinais clínicos neurológicos (SCHATZBERG; NGHIEM, 2012).

Cães infectados pelo vírus da cinomose canina geralmente desenvolvem alterações sistêmicas graves com depleção linfóide importante, viremia e acometimento de vários sistemas, como pele, glândulas endócrinas e exócrinas, epitélio gastrointestinal, sistema respiratório e genitourinário. No SNC o vírus causa lesões multifocais na substância cinzenta e branca, que pode cursar com necrose e polioencefalomalácia. A gravidade da doença é influenciada pela presença de imaturidade do sistema imune ou por imunossupressão (GREENE; APPEL, 2006).

Infeções bacterianas no SNC são incomuns nos animais de companhia quando comparadas com meningoencefalites bacterianas em humanos, porém não se sabe se isto ocorre por baixa frequência nos animais ou se o diagnóstico é difícil devido à evolução clínica hiperaguda ou aguda com sinais sistêmicos e óbito precoce (RADAELLI; PLATT, 2002; GREENE; APPEL, 2006; DIOGO; CAMASSA, 2015; MAIORKA, 2015).

Na presença de sinais clínicos de doença no SNC com sinais de inflamação/infecção da orofaringe e febre, otite média ou otite interna, a suspeita de infecção bacteriana deve ser considerada. A leucocitose pode ou não estar presente nesses casos (RADAELLI; PLATT, 2002). A infecção pode ocorrer por solução de continuidade, via hematogênica com foco infeccioso distante, bacteremia e embolia séptica com lesão da barreira hemato-encefálica (BHE), iatrogênica durante procedimentos invasivos (ex.: colheita de LCE) e traumática com invasão direta (ex.: mordeduras) (RADAELLI; PLATT, 2002; MAIORKA, 2015). Dependendo da bactéria envolvida na infecção pode ocorrer a forma não piogênica ou piogênica com a formação de abscessos epidurais, subdurais ou cerebrais (MAIORKA, 2015).

Os principais agentes infecciosos encontrados na América do Sul que causam meningoencefalite no cão e no gato estão listados na tabela 1.

**Quadro 1** - Principais agentes infecciosos conhecidos por causar meningoencefalites em cães e gatos na América do Sul.

AGENTE	CÃES
<b>BACTERIANA</b>	Bactérias aeróbicas e anaeróbicas
<b>RICKETSIA</b>	<i>Rickettsia rickettsii</i> <i>Ehrlichia spp.</i> <i>Anaplasma spp</i>
<b>VIRAL</b>	Vírus da cinomose canina (CDV) Vírus da raiva
<b>PROTOZOÁRIO</b>	<i>Neospora caninum</i> <i>Toxoplasma gondii</i> <i>Babesia spp. (raro)</i> <i>Leishmania spp</i>
<b>FÚNGICO</b>	<i>Criptococcus spp.</i> <i>Coccidioides immitis</i> <i>Blastomices dermatitidis</i>
<b>PARASITÁRIO</b>	<i>Dirofilaria immitis (raro)</i>

Fonte: Schatzberg e Nghiem (2012, p. 342) adaptado.

Doenças congênitas e do desenvolvimento são mais comuns em animais jovens, como por exemplo a hidrocefalia, lisencefalia e hipoplasia cerebelar, enquanto que a epilepsia idiopática, ocorre mais comumente na fase adulta (ANDRADE NETO, 2015a).

Intoxicações e lesões traumáticas não tem predileção por idade, porém animais jovens são mais susceptíveis. A estricnina, metaldeído, organoclorados, organofosforados, chumbo, etilenoglicol, inseticidas, rodenticidas, medicamentos, produtos de uso doméstico e drogas ilícitas são os agentes tóxicos mais frequentemente encontrados nas encefalopatias tóxicas (ANDRADE NETO, 2015a; TAYLOR, 2015).

Doenças vasculares como hipertensão (encefalopatia hipertensiva), hipercoagulabilidade e vasculite (acidente vascular encefálico) são causas comuns de encefalite em humanos e menos descritas em animais (DAMIANI et al., 2013; TAYLOR, 2015). É importante também investigar distúrbios metabólicos como encefalopatia hepática, hipoglicemia, uremia grave, alterações eletrolíticas, hiperosmolaridade, hipoadrenocorticismo, desidratação e coma por hipotireoidismo como doenças de base (TAYLOR, 2015).

Em animais idosos as doenças degenerativas e neoplásicas são frequentes, mas podem ocorrer em animais jovens. São exemplos de doenças degenerativas: desmielinização, leucodistrofias, encefalopatias mitocondriais, degenerações espongiiformes, doenças do armazenamento lisossomal, degeneração neuronal prematura (abiotrofia), doença de Láfora,

síndrome da disfunção cognitiva, lipofuscinose ceróide neuronal e abiotrofia cortical cerebelar (ANDRADE; NETO, 2015a).

### 2.1.3 Diagnóstico

#### 2.1.3.1 Exames de triagem do paciente neurológico

Para se obter o diagnóstico da causa da encefalite é recomendada a realização de exames complementares, como exames laboratoriais de rotina (hemograma, análise bioquímica, hemogasometria e urinálise), exames laboratoriais direcionados (Reação em Cadeia de Polimerase (PCR's), sorologias, eletroforese de proteínas, avaliação hormonal e dosagem sérica de ácidos biliares), exame bioquímico, citológico e microbiológico do líquido cefalorraquidiano (LCE), ressonância magnética (RM), tomografia computadorizada (TC), mielografia, ultrassonografia doppler transcraniana, radiografia (RX) e eletroencefalografia (FERNÁNDEZ; BERNARDINI, 2010; ANDRADE NETO, 2015b; CARVALHO, 2015).

Nas situações em que há suspeita de comorbidades, a exemplo de doenças metabólicas, neoplásicas e degenerativas indica-se a realização de ultrassonografia abdominal e radiografia de tórax (ANDRADE NETO, 2015c).

Pacientes com alterações em outros sistemas (descompensação cardiovascular ou respiratória, por exemplo) e/ou sinais de aumento da pressão intracraniana (PIC) devem ser estabilizados inicialmente em caráter de urgência antes de prosseguir com a investigação diagnóstica. Quando o paciente está estável, na presença de sinais clínicos de MEM, o clínico deve diferenciar entre MEM idiopática e infecciosa com base nos sinais clínicos, análise do LCE e neuroimagem avançada (SCHATZBERG; NGHIEM, 2012).

O LCE ainda é o fluido mais utilizado para diagnosticar doenças encefálicas e multifocais devido ao seu contato direto com o encéfalo, sendo considerado o fluido biológico de maior importância para análises laboratoriais com o objetivo de fornecer informações precoces de alterações centrais (TRENCHESKA et al., 2012; DEWEY; COSTA; DUCOTÉ, 2016).

O LCE banha o cérebro e a medula espinhal, é derivado do plasma e é produzido no plexo coroide do ventrículo lateral, terceiro e quarto ventrículos, mas também por capilares sanguíneos cerebrais, células parenquimatosas e endoteliais (DEWEY; COSTA; DUCOTÉ, 2016). A análise do líquido cefalorraquidiano (LCE) é uma ferramenta importante para a investigação de doenças do SNC (SOILA, 2015).

Mudanças bioquímicas no cérebro podem ser refletidas no LCE. Sua coloração é clara e geralmente tem um baixo teor de proteínas e pouca celularidade (RADAELLI; PLATT, 2012; ZETTERBERG et al., 2016). Quando a barreira hematoencefálica está comprometida na presença de uma doença no SNC, os valores de proteína, celularidade e demais aspectos podem estar alterados (RADAELLI; PLATT, 2012). É raro encontrar microrganismos e células neoplásicas no LCE, porém quando isso ocorre é possível determinar o diagnóstico definitivo (DEWEY; COSTA; DUCOTÉ, 2016).

As indicações para a colheita e análise do LCE são: encefalopatias (qualquer doença encefálica, inclusive episódios convulsivos, devem levar o clínico a considerar a análise do LCE como elemento do plano diagnóstico), doenças da medula espinhal ou mielopatias (as quais não foram esclarecidas por meio de exames de imagem) e doenças que afetam as raízes de nervos espinhais (DEWEY; COSTA; DUCOTÉ, 2016).

No entanto, a indicação da punção do LCE irá depender dos diagnósticos diferenciais e da avaliação minuciosa das vantagens e desvantagens do procedimento para o caso em questão. É necessário salientar que em casos de suspeita de aumento da pressão intracraniana (PIC) há risco de ocorrer herniação de algumas estruturas cerebrais e comprometimento do tronco encefálico, que muitas doenças do SNC não levam a alterações no LCE, que as alterações encontradas no LCE geralmente são inespecíficas e que o clínico deve avaliar se a técnica e a anestesia não estão contraindicadas ao paciente (FERNÁNDEZ; BERNARDINI, 2010).

Não há vantagem aparente na punção lombar em comparação com a cisterna magna (cerebelo-medular) em termos de riscos de herniação. O uso de manitol, hiperventilação e corticosteroides podem ser utilizados para minimizar o risco de herniação na suspeita de aumento da PIC ao realizar a punção para a colheita do LCE. Exames de RM ou TC devem ser realizados diante da suspeita de efeito de massa com aumento da PIC antes da indicação da colheita do LCE (DEWEY; COSTA; DUCOTÉ, 2016).

As contraindicações para a colheita do LCE são comprometimento do estado clínico do paciente para ser submetido à anestesia geral, evidências de coagulopatias, instabilidade ou suspeita de doença no local da punção (ex.: instabilidade atlanto-axial), hidrocefalia, trauma cranioencefálico, exames de imagem confirmando lesões encefálicas que causem efeito de massa, sinais clínicos sugestivos de aumento da pressão intracraniana e falta de experiência do clínico no momento da colheita (riscos de penetração inadvertida do parênquima cerebelo-medular) (RADAELLI; PLATT, 2012; DEWEY; COSTA; DUCOTÉ, 2016).

Vários exames e testes diagnósticos podem ser realizados utilizando amostras de LCE, como a contagem total de células, diferenciação celular e nível de proteína. A glicose pode ser

mensurada e equivale a 60 a 80% da glicemia (Quadro 2). Na suspeita de doenças infecciosas e inflamatórias pode-se realizar culturas fúngica e bacteriológica, eletroforese de proteínas, sorologias, amplificação do material genético por meio de reação em cadeia da polimerase (PCR) e citometria de fluxo (DEWEY; COSTA; DUCOTÉ, 2016). Biomarcadores, como proteínas, podem ser mensurados no LCE para diagnóstico de encefalopatias (PELINKA et al., 2004). Os valores de referência para a análise do LCE estão no quadro 2.

**Quadro 2** - Aspectos normais do LCE e valores de referência

PARÂMETRO	CÃO
COR	Incolor
ÍNDICE DE REFRAÇÃO	1,3347 – 1,3350
PESO ESPECÍFICO / DENSIDADE	1,004 – 1,006
PROTEÍNAS TOTAIS	10 – 27 mg/dl (cervical) <45 mg/dl (lombar)
ALBUMINA	5 – 28 mg/dl
TESTE DE PANDY	Negativo
FITA DE URINA:	
PH	8 +/- 1
PROTEÍNAS	Traços a 30
GLICOSE	Traços a +
SANGUE	Negativo
QUANTIDADE DE CÉLULAS	<5/mm <sup>3</sup> (cervical) <2/mm <sup>3</sup> (lombar)
TIPO CELULAR	mononucleares

**Fonte:** Fernández e Bernardini (2010, p. 109).

Na cultura microbiológica do LCE a identificação de microorganismos não é comum, porém quando a cultura é positiva, os agentes infecciosos encontrados são: *E. coli*, *Streptococcus*, *Klebsiela spp*, *Stafilococcus spp*, *Pasteurela spp*, *Actinomyces spp*, *Nocardia spp*, *Fusobacterium*, *Bacteroides spp*, entre outros anaeróbicos (RADAELLI; PLATT, 2002).

Para a contagem celular e morfologia celular, a análise do LCE deve ser realizada dentro de 30 minutos a partir do momento da colheita, porém há evidências de que a contagem de células é segura em até 48 horas após a colheita se for adicionado soro autólogo na amostra. O tratamento prévio com corticosteroides pode reduzir a inflamação no SNC, podendo afetar os resultados da análise do LCE em pacientes com doenças inflamatórias (DEWEY; COSTA; DUCOTÉ, 2016).

Outros métodos diagnósticos incluem os biomarcadores, que são rotineiramente estudados e utilizados em pacientes humanos com doenças encefálicas, uma vez que auxiliam a determinar a gravidade da doença e conseqüentemente o prognóstico (SCHRIEFER; CARVALHO, 2008; COSTA; GAGO; GARRETT, 2011). Outras vantagens em se utilizar os biomarcadores é que podem oferecer, de forma não invasiva, dados objetivos, acessíveis e práticos, relacionados com a presença de dano cerebral e a extensão da lesão (COSTA; GAGO; GARRETT, 2011).

## 2.2 BIOMARCADORES

Um biomarcador é uma molécula que indica alteração na fisiologia, que pode ser medido objetivamente como indicador de processos biológicos normais ou patológicos, intervenções terapêuticas, respostas farmacológicas e eficácia de um tratamento (KEWAL, 2015b). Os biomarcadores podem ser moléculas simples como metabólitos, carboidratos, esteroides ou lipídeos, assim como moléculas mais complexas, como peptídeos e proteínas (ex.: insulina, hemoglobina A e C e proteína C reativa) e células, que são biomarcadores ainda mais complexos (ex.: plaquetas, autoanticorpos e células T). A complexidade do biomarcador aumenta na medida que a complexidade do fenótipo clínico do paciente também aumenta (KEWAL, 2010).

A tecnologia de diagnóstico molecular vem sendo estudada por pesquisadores e utilizada para diagnosticar várias doenças, como câncer, distúrbios metabólicos, infecções e doenças no SNC (KEWAL, 2015a). Na indústria farmacêutica o foco é diferente, os biomarcadores são estudados para descoberta de novas drogas. Um exemplo é o desenvolvimento de fármacos de anticorpos monoclonais baseados na farmacogenética (farmacocinética e farmacodinâmica) e farmacogenômica (marcadores de haplótipos, alterações na expressão, ou inativação de genes, que podem estar correlacionados com função farmacológica e resposta terapêutica) na oncologia (KEWAL, 2010; KEWAL, 2015).

Os biomarcadores são divididos em três grandes categorias: 1. os que acompanham a progressão da doença e auxiliam na tomada de uma decisão clínica já conhecida; 2. os que detectam um efeito de uma determinada droga; 3. os que auxiliam como parâmetros de substituição em ensaios clínicos (KEWAL, 2010).

### 2.2.1 BIOMARCADORES DE LESÃO ENCEFÁLICA

De forma semelhante a outros exames de função para outros órgãos, a mensuração de um biomarcador de lesão cerebral de forma simples e rápida poderá proporcionar benefícios ao paciente (PELINKA et al., 2004).

Dentre uma extensa gama de biomarcadores utilizados em pacientes com encefalite, a proteína glial fibrilar ácida (GFAP), proteína S-100B e a enolase neuronal específica (NSE) são amplamente estudadas (ZUREK, FEDORA, 2012; ZENAIDE, FLORES, 2013).

Estudos também apontam a Ubiquitina Hidrolase C terminal L1 (UCH-L1), proteína mielínica básica (MBP), neurofilamento-H fosforilado (pNF-H), Interleucina 6 (IL-6), fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) e a proteína tau como biomarcadores de lesão neuronal e inflamação no SNC (MÖRTBERG et al., 2011; YANG et al., 2017).

Os níveis da proteína S-100B e da NSE se elevam rapidamente no sangue após lesão encefálica, porém ambas não específicas de lesões no SNC. A proteína S100-B se eleva em casos de infarto de miocárdio, infarto de melanoma maligno e após uma reanimação cardiopulmonar devido às compressões torácicas e lesões de condrócitos. A NSE também é detectada no soro de pacientes com doenças pulmonares (WIESMANN et al., 2010; ZENAIDE; FLORES, 2013).

### 2.2.2 PROTEÍNA FIBRILAR GLIAL ÁCIDA – GFAP

Descrita pela primeira vez em 1971, a proteína glial fibrilar ácida (GFAP – *Glial Fibrillary Acidic Protein*) foi caracterizada como uma proteína filamentososa intermediária encontrada exclusivamente no citoesqueleto de astrócitos no SNC. Estudos posteriores relacionaram a proteína com resposta tissular à lesão cerebral (LENZ, 1996; ZUREK; FEDORA, 2012).

As células gliais possuem inúmeras funções, entre elas destacam-se a função estrutural e nutritiva para outras células formando uma rede de filamentos para sustentação. As células da glia também oferecem nutrientes para as células do encéfalo e medula espinhal, participam da resposta imunológica cerebral, estocam glicogênio e fornecem energia ao cérebro, formam tecido cicatricial em áreas lesionadas no SNC, modulam sinapses no SNC, participam da composição e manutenção da barreira hematoencefálica, intermedeiam o transporte de substância entre neurônios e células sanguíneas, entre outras funções (LENZ, 1996; SATO et al., 2013; TODA et al., 2017; ZUREK; FEDORA, 2012).

Os astrócitos são as maiores células gliais e mais abundantes na glia, sendo encontrados dois tipos: fibrosos e protoplasmáticos. Os astrócitos protoplasmáticos são encontrados na substância cinzenta, enquanto que os astrócitos fibrosos são encontrados na substância branca. São caracterizados por sua grande quantidade de processos fibrosos e importância na síntese de proteínas filamentosas intermediárias como a GFAP (LENZ, 1996).

Em condições fisiológicas a GFAP não é secretada de forma ativa, sendo assim, esta não é detectável ou é sintetizada em baixas concentrações em indivíduos saudáveis (FOERCH et al., 2012). Os polímeros filamentosos de GFAP são insolúveis, porém quando há destruição de astrócitos, os filamentos de GFAP são liberados na forma solúvel no líquido cefalorraquidiano (LCE), facilitando também sua difusão no plasma quando a barreira hematoencefálica está danificada (SATO et al., 2013; TODA et al., 2017).

Após ocorrer lesão encefálica e/ou medular as células gliais, principalmente os astrócitos, reagem rapidamente sintetizando grande quantidade de GFAP a fim de reparar o dano, aumentando substancialmente os níveis plasmáticos da proteína (ZUREK, FEDORA, 2012). Os níveis de GFAP no sangue e no LCE de pacientes humanos com lesão neuronal, aumentam significativamente quando comparados com pacientes saudáveis (grupo controle) e estão relacionados a várias doenças neurológicas, como o Lúpus Eritematoso Sistêmico (LES), esclerose múltipla, doença de Alzheimer, hemorragia subaracnóidea e lesão cerebral traumática (FRASER et al., 2011; SHAFIE et al., 2013).

Em pacientes humanos com acidente vascular cerebral, foi demonstrado que a GFAP é liberada rapidamente na presença de sangramento cerebral, enquanto que em acidentes isquêmicos a proteína aumenta de forma mais lenta e gradativa, sendo indicada a mensuração desta para diferenciar o acidente vascular agudo de acidente isquêmico em pacientes na triagem pré-hospitalar a fim de aumentar a frequência de trombólise e encurtar o tempo até o início do tratamento (FOERCH et al., 2012).

A liberação da GFAP não é influenciada por fatores extracranianos como ocorre com a S-100B e a NSE, podendo ser caracterizada como um biomarcador específico do SNC, sendo que a elevação de seus níveis está relacionada com mau prognóstico e recuperação tardia dos pacientes (FRASER et al., 2011; ZUREK; FEDORA, 2012).

Pelinka et al. (2004), pesquisaram a GFAP no soro de 101 pacientes humanos com trauma cranioencefálico e 13 pacientes politraumatizados sem trauma cranioencefálico utilizando um “kit ELISA”, observando que as concentrações séricas da proteína nos pacientes com lesão cerebral estavam marcadamente aumentadas, enquanto que nos pacientes politraumatizados sem lesão cerebral o resultado foi negativo. Os resultados do estudo sugerem

que o a liberação da proteína só ocorre na presença de dano neurológico e que a mesma pode ser um biomarcador específico de lesão encefálica. A classificação de Marshall foi fortemente correlacionada com os níveis séricos de GFAP, refletindo a relação do aumento da proteína com a extensão do dano cerebral (PELINKA et al., 2004).

Fraser et al. (2011) estudaram a GFAP como biomarcador no prognóstico de crianças internadas em unidades de terapia intensiva pediátrica (UTIP) após trauma crânio-encefálico submetidas aos tratamentos com hipotermia e normotermia. As crianças foram avaliadas com a escala de Glasgow e a categoria de desempenho cerebral pediátrico (PCPC) para determinar a gravidade da lesão. Onde, PCPC 1 é normal, 2 é incapacidade leve, 3 é incapacidade moderada, 4 é incapacidade grave, 5 é estado vegetativo e 6 é morte. Os autores relatam o aumento da GFAP no LCE e no soro de crianças com lesão encefálica e uma correlação positiva entre os níveis mais elevados do biomarcador em pacientes com PCPC >2, inferindo que a GFAP pode ser indicada para se avaliar o prognóstico da lesão (FRASER et al., 2011).

Mörtberg et al. (2011) pesquisaram a elevação sérica da proteína GFAP, S-100B, NSE e BDNF em 31 pacientes humanos em coma internados em unidades de terapia intensiva do Hospital Universitário de Uppsala após parada cardio-respiratória e atividade elétrica sem pulso (PCR-AESP) e reanimação cardiovascular, submetidos à hipotermia. Os autores mensuram os biomarcadores de forma seriada nos tempos 1, 2, 6, 12, 24, 48 e 96 horas após a parada cardíaca e verificaram que os níveis séricos de GFAP se elevaram significativamente após 48 horas da parada cardíaca, enquanto os demais biomarcadores se elevaram mais precocemente, com destaque para a proteína S-100B, sugerindo que em humanos a GFAP pode não detectar lesões cerebrais nas primeiras 48 horas pós-parada cardiorrespiratória e lesão cerebral, por apresentar seu pico sérico após 48 horas de lesão encefálica e iniciar um decréscimo após 96 horas (MÖRTBERG et al., 2011).

Toda et al. (2017) estudaram a elevação dos níveis de GFAP e auto-anticorpos anti-GFAP no LCE de 82 cães de variadas raças com diferentes doenças no SNC. 32 cães apresentavam confirmação diagnóstica de meningoencefalite necrotizante (NME), sendo 16 Pugs e os demais de raças variadas. Um grupo controle foi formado com cães saudáveis, sendo cinco Pugs, 16 Beagles e quatro Labradores, todos com exames normais. Um teste ELISA humano foi utilizado no estudo e os resultados foram promissores. Os autores verificaram que cães saudáveis da raça Pug podem apresentar valores de GFAP elevados no LCE mesmo com exames de RM normais e ausência de sinais clínicos, que a GFAP se manteve mais elevada nos cães com NME do que em cães com outras doenças no SNC e que a maioria dos cães com NME e aumento de GFAP foram da raça Pug. Os autores concluíram que a GFAP pode ser um bom

biomarcador para o diagnóstico de NME e que o aumento da GFAP em cães da raça Pug com e sem NME pode auxiliar na melhor compreensão da patogênese da doença. Os autores sugerem que cães da raça Pug precisam ser mais estudados para verificar a possibilidade de apresentarem fragilidade de astrócitos e conseqüente extravasamento da GFAP no LCE mesmo na ausência de doença no SNC (TODA et al., 2017).

Sato et al. (2013), utilizaram soro de 51 cães com DDIV e paraplegia com suspeita de mielomalácia isquêmica e hemorrágica para mensurar a GFAP utilizando um kit ELISA disponível para seres humanos. Foi demonstrado no estudo que os níveis séricos de GFAP se elevaram substancialmente nos pacientes que desenvolveram mielomalácia. O mecanismo fisiopatológico da doença ainda é discutido, mas sabe-se que após um trauma hemorrágico com perda da vascularização colateral da medula espinhal ou após trauma medular secundário à DDIV e conseqüente isquemia medular, ocorre necrose dos neurônios de forma ascendente e irreversível. Nessas condições de lesão neuronal ativa, a GFAP é liberada para o LCE e para o soro, sendo possível prever o desenvolvimento da mielomalácia em cães com paraplegia (GRIFFITHS, 1972; SATO et al., 2013).

### 2.2.3 AMOSTRAS BIOLÓGICAS PARA A MENSURAÇÃO DA GFAP POR ENSAIO ENZIMÁTICO E SUA APLICABILIDADE NA MEDICINA VETERINÁRIA

Um bom teste de função cerebral idealmente viabilizaria o uso de amostras de soro, material de fácil acesso e disponibilidade para os pacientes quando comparado ao LCE (PELINKA et al., 2004).

O líquido cerebrospinal (LCE) parece ser mais fidedigno para a mensuração de biomarcadores de lesão neuronal por sua proximidade com o encéfalo, porém dependendo da condição clínica do paciente, a utilização do LCE torna-se inacessível, sendo indicados outros fluidos corporais como sangue e urina (COSTA; GAGO; GARRETT, 2011).

Rech e colaboradores em seus estudos realizados com biomarcadores em pacientes comatosos que sofreram anóxia cerebral pós-parada cardiorrespiratória (PCR), reforçaram que a dosagem das proteínas no sangue é mais vantajosa do que no LCE para os pacientes instáveis e com aumento da pressão intracraniana (PIC), evitando assim os riscos inerentes ao procedimento de colheita do LCE nesses pacientes (RECH et al., 2006).

A literatura veterinária atual é escassa em informações sobre o uso de biomarcadores neuronais, incluindo a GFAP, não há dados consistentes sobre a expressão da proteína em cães com encefalite e a mensuração desta em fluidos corporais, tampouco valores de referência. Faz-

se necessário mais estudos a respeito de biomarcadores de lesão neuronal em cães, em especial a GFAP, que demonstra ser um biomarcador promissor para uso em animais.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

Mensurar a GFAP no soro e líquido cefalorraquidiano de cães com doenças neurológicas centrais e no soro de cães sem sinais clínicos de doença (hígidos).

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Localizar a lesão no SNC de cães com alterações neurológicas centrais;
- Obter valores e possível aumento da GFAP no soro de cães com e sem encefalopatias, e no líquido cefalorraquidiano (LCE) de animais com encefalopatias;
- Verificar a eficiência da GFAP como biomarcador de lesão encefálica em cães;

O trabalho será apresentado na forma de artigo seguindo as normas da Revista de Pesquisa Veterinária Brasileira.

## Uso da GFAP como biomarcador em cães com e sem sinais neurológicos centrais<sup>1</sup>

Cristiane O. Caetano<sup>2\*</sup>, Karina K. M. da C. Flaiban<sup>3</sup>, João L. Garcia<sup>4</sup>, Ana Sue Sammi<sup>5</sup>, Lucas A. Gomes<sup>6</sup>

**ABSTRACT.** – Caetano C. O., Flaiban K. K., Headley S. A., Garcia J. L., Sammi A. S., Gomes L. A. 2018. [Use of GFAP as biomarker in dogs with and without central neurological signs] Uso da proteína fibrilar ácida como biomarcador em cães com e sem sinais neurológicos centrais. Pesquisa Veterinária Brasileira 00(0): 00-00. Departamento de Clínicas Veterinárias, Universidade Estadual de Londrina, Avenida Olavo Garcia Ferreira da Silva, s/n, Campus Universitário, Londrina, PR, 86051-990, Brazil. E-mail: [cristianecaetano2850@hotmail.com](mailto:cristianecaetano2850@hotmail.com).

This study verified the expression of the glial fibrillary acidic protein (GFAP) in the serum of dogs with encephalitis and healthy dogs and in the CSF of some dogs with encephalitis. Twenty one serum samples and 7 (seven) CSF samples from dogs with encephalitis or meningoencephalitis (sick group - SG) and 10 serum samples from healthy dogs (control group - CG) were tested, totaling 31 dogs studied. The inclusion interval of the animals in this study was from October 2016 to June 2017. The biomarker was measured and a value in ng / ml was obtained for each sample. An increase in GFAP was observed in serum of 6/21 SG dogs, whereas in CG no animal had elevated serum levels above the cutoff point. The mean of the GFAP in the serum of SG animals was 2.49 ng / ml, in the CSF it was 33.07 ng / ml, and the serum of the CG dogs was 0.11 ng / ml. The nonparametric statistical analysis Kruskal Wallis failed to explain the results of the study, due to the large number of results equal to zero of the SG and the heterogeneity of the data. In this case, we consider the descriptive statistics for the evaluation of the results and the conclusion of this work. Thus, because SG obtained a mean above CG in the measurement of GFAP in serum, it is suggested that the protein is expressed only in the presence of brain lesion in dogs and that it can be used as a biomarker to detect active brain lesion. It was also possible to verify that the studied dogs presented serum elevations of GFAP after 5 (five) days of brain injury, that the biomarker presented a high specificity and that healthy animals did not present detectable levels of the GFAP in the serum. The study also suggests a greater sensitivity of the CSF for the test and that the human ELISA kit used in the study obtained a good efficacy for use in dogs.

INDEX TERMS: Animal, brain, encephalon, lesion, protein.

**RESUMO.** – Este estudo verificou a expressão da proteína fibrilar glial ácida (GFAP) no soro de cães com encefalite e de cães saudáveis e no LCE de alguns cães com encefalite. 21 amostras de soro e sete amostras de LCE de cães com encefalite ou meningoencefalite (grupo doente – GD) e 10 amostras de soro de cães saudáveis (grupo controle – GC) foram testadas, totalizando 31 cães estudados. O intervalo de inclusão dos animais neste estudo foi de outubro de 2016 a junho de 2017. O biomarcador foi mensurado e um valor em ng/ml foi obtido para cada amostra. Foi observado um aumento da GFAP no soro de 6/21 cães do GD, enquanto que no GC nenhum animal apresentou níveis séricos elevados acima do ponto de corte. A média da GFAP no soro de animais do GD foi de 2,49 ng/ml, no LCE foi de 33,07 ng/ml, e no soro dos cães do GC foi de 0,11 ng/ml. A análise estatística não paramétrica Kruskal Wallis não conseguiu explicar os resultados do estudo, devido ao grande número de resultados igual a zero do GD e à heterogeneidade dos dados. Neste caso, considera-se a estatística descritiva para a avaliação dos resultados e a conclusão deste trabalho. Assim sendo, como o GD obteve média superior ao GC na mensuração da GFAP no soro, sugere-se que a proteína seja expressa somente na presença de lesão encefálica em cães e que possa ser utilizada como um biomarcador para detectar lesão encefálica ativa. Também foi possível verificar que os cães estudados apresentaram elevações séricas de GFAP após 5 dias de lesão encefálica, que o biomarcador apresentou uma alta especificidade e que animais saudáveis não apresentam níveis detectáveis da GFAP no soro. O estudo também sugere uma maior sensibilidade do LCE para a realização do teste e que o kit ELISA humano utilizado no estudo obteve uma boa eficácia para uso em cães.

**TERMOS DE INDEXAÇÃO:** Animal, cérebro, encéfalo, lesão, proteína.

### INTRODUÇÃO

Doenças neurológicas centrais levam ao quadro de encefalite, que é a inflamação e lesão tecidual com alteração estrutural ou funcional do encéfalo causada por qualquer afecção (DAMIANI et al., 2013). A lesão pode ser focal, multifocal ou difusa e a manifestação clínica de doença intracraniana depende da região do encéfalo acometida (FERNÁNDEZ; BERNARDINI, 2010; TAYLOR, 2015).

Para que o diagnóstico da doença de base seja feito, são indicados vários exames complementares, entre eles o diagnóstico por imagem com Ressonância Magnética (RM) e/ou Tomografia Computadorizada (TC). No Brasil a indisponibilidade do equipamento fora de grandes centros e o custo elevado do exame, pode limitar o seu uso. A análise do LCE também é muito importante, entretanto alguns pacientes podem não ter condições clínicas favoráveis para a realização da punção do LCE (NISHIDA et al., 2014; ELIAS, 2016).

É importante avaliar a extensão da lesão em pacientes com doenças neurológicas para estabelecer o prognóstico e o tratamento. Vários biomarcadores específicos do SNC estão sendo utilizados na medicina humana, pois podem ser mensurados nos fluidos corporais e auxiliar nesse processo, além de permitir a monitorização da evolução da doença de forma pouco invasiva, principalmente em pacientes críticos (RECH et al., 2006; ELIAS, 2006).

Uma preocupação dos pesquisadores é que alguns biomarcadores, a exemplo da proteína S-100 $\beta$  e da Enolase Neuronal Específica (NSE) podem estar presentes na corrente sanguínea independentemente de lesão neuronal, fator este que poderia interferir nos resultados quando se busca avaliar lesão neuronal (LEI et al., 2015).

Lei et al. (2015) pesquisaram a Proteína Fibrilar Glial Ácida (GFAP) em pacientes humanos com lesões cerebrais traumáticas graves e relatam possível superioridade deste exame frente aos demais biomarcadores, devido à sua especificidade para o tecido neuronal e por não ser detectável em indivíduos saudáveis. Os níveis de GFAP aumentaram substancialmente em até 5 dias nos pacientes com TCE grave e os valores mais altos foram nos pacientes com pior evolução clínica ou que morreram. Os autores sugerem que o biomarcador pode ser também preditivo de lesões neurológicas em até 6 meses pós-trauma (LEI et al., 2015).

Descrita pela primeira vez em 1971, a proteína fibrilar glial ácida (GFAP – Glial Fibrillary Acidic Protein) foi caracterizada como uma proteína filamentososa intermediária encontrada exclusivamente no citoesqueleto de astrócitos no SNC. Estudos posteriores relacionaram a proteína com resposta tissular à lesão cerebral (LENZ, 1996; ZUREK; FEDORA, 2012).

Os polímeros filamentosos de GFAP são insolúveis, porém quando há destruição de astrócitos, os filamentos de GFAP são liberados na forma solúvel no líquido cefalorraquidiano (LCE), facilitando também sua difusão no plasma quando a barreira hematoencefálica está danificada (SATO et al., 2013; TODA et al., 2017).

A GFAP pode ser um bom biomarcador para o diagnóstico de Meningoencefalite Necrotizante do Pug (NME) e o desenvolvimento de auto-anticorpos anti-GFAP nos cães com a doença pode auxiliar na melhor compreensão da patogênese da doença (SATO et al., 2017).

Miyake et al, estudaram em 2013 a elevação dos níveis séricos de GFAP em cães da raça Pug com e sem NME e cães de outras raças com e sem NME. No estudo verificaram que todos os cães Pug com NME apresentaram elevação sérica de GFAP, além de 4 Chihuahuas e 2 Shih-Tsus com NME. Dois cães saudáveis da raça Pug apresentaram aumento limítrofe de GFAP no soro, enquanto que nenhum cão saudável de outra raça apresentou aumento sérico de GFAP. Os autores sugerem que cães da raça Pug tenham uma maior fragilidade de astrócitos podendo expressar a GFAP mesmo na ausência de doenças do SNC e que a GFAP pode ser utilizada no diagnóstico de NME em cães da raça PUG. A possível fragilidade de astrócitos na raça Pug pode explicar a patogênese da NME (MIYAKE et al., 2013).

Um estudo com 51 cães com Doença do Disco Intervertebral (DDIV) e paraplegia e suspeita de mielomalácia foi realizado mensurando GFAP no soro. Verificou-se que os animais que desenvolveram mielomalácia apresentaram níveis séricos de GFAP elevados substancialmente quando comparados aos cães que não desenvolveram mielomalácia, sendo possível prever o desenvolvimento da doença em cães com paraplegia (SATO et al., 2013).

A GFAP é pouco estudada na Medicina Veterinária e não há dados consistentes sobre a expressão da proteína em cães com encefalite e a mensuração desta em fluidos corporais. Assim como em humanos, a proteína parece ser boa candidata a biomarcador de lesão encefálica em cães. O objetivo geral deste trabalho é então mensurar a Proteína Fibrilar Glial Ácida no soro e LCE de cães com encefalopatias e no soro de cães sem encefalopatias.

## MATERIAL E MÉTODOS

Trata-se de um estudo prospectivo a ser realizado utilizando amostras biológicas de cães que apresentam sinais de doenças neurológicas centrais, atendidos em um Hospital-Escola Veterinário em Londrina-PR e cães hígidos de uma população não-hospitalar de Londrina-PR.

Entre outubro de 2016 a junho de 2017 foram avaliados 31 cães, sendo 21 cães com sinais clínicos de encefalite ou meningoencefalite / meningoencefalomielite e 10 cães sem sinais clínicos de doença e

sem alterações laboratoriais, todos provenientes da cidade de Londrina-PR, atendidos em um hospital-escola veterinário.

O presente estudo obteve aprovação da comissão de ética no uso de animais (CEUA-UEL) no dia 20/09/2016 (protocolo nº17355.2016.05).

### **Desenho e critérios de inclusão**

Os animais foram alocados em dois grupos: Grupo Doente (GD) referente aos animais doentes, e Grupo Controle (GC) composto pelos animais saudáveis. Os animais do GD foram avaliados mediante exame clínico, neurológico e laboratoriais; o mesmo ocorreu com os animais do GC, com exceção do exame neurológico.

Os animais classificados como doentes foram selecionados sem distinção de raça, sexo, peso e idade. Como critério de inclusão para este grupo, os animais precisavam apresentar sinais clínicos de lesão neurológica central por doença primária no SNC.

Os animais do GC classificados como saudáveis foram selecionados sem distinção de raça e sexo, porém foram excluídos do estudo animais obesos ou com baixo escore corporal, filhotes com idade inferior a 12 meses de idade, gestantes e lactantes. Como critério de inclusão para este grupo, os animais precisavam apresentar parâmetros fisiológicos normais no exame físico, resultados de exames laboratoriais (hemograma e bioquímica sérica) dentro da normalidade e ausência de doença sistêmica evidente.

Os cães de ambos os grupos foram submetidos à venopunção de veia jugular para a colheita da amostra de sangue para a realização dos exames laboratoriais (hemograma e bioquímica sérica). Os cães do GD que foram submetidos à colheita e análise de LCE por indicação clínica, tiveram as amostras de LCE aproveitadas no estudo para a mensuração da GFAP.

### **Mensuração da GFAP**

Para a dosagem da GFAP em ambos grupos, foram utilizadas amostras de soro processadas e armazenadas conforme orientações do fabricante do kit ELISA utilizado.

Foi utilizado o kit ELISA NS830 Merk Milipore para a dosagem sérica do biomarcador GFAP. O kit contém 96 poços para a realização de 38 amostras em duplicata e 10 amostras padrões para a padronização.

### **Avaliação dos Resultados**

Um conjunto de dados foi obtido com variáveis numéricas contínuas do biomarcador e os resultados foram analisados utilizando o programa estatístico R-Studio para obter valores de média, mediana e desvio padrão de cada grupo. Dados epidemiológicos foram registrados para posterior análise. Devido à grande variabilidade nos resultados, e pelos dados não possuírem uma distribuição normal, houve a necessidade de se aplicar um teste estatístico não paramétrico. Neste caso, o teste selecionado foi o Kruskal Wallis, realizado concomitantemente com a análise estatística descritiva.

O teste Kruskal Wallis foi realizado no programa estatístico R-Studio. Um valor de  $p \leq 0,05$  foi considerado significativo, rejeitando-se  $H_0$ , em que  $H_0 = \mu_{GD} = \mu_{GC}$  (as médias não diferem entre os grupos e não há diferença estatística entre as médias) e  $H_1 = \mu_{GD} \neq \mu_{GC}$  (as médias diferem entre os grupos e há diferença estatística entre as médias).

## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

Foram estudados 31 cães, sendo 21 alocados no GD e 10 no GC. Dos 21 cães do GD, 11/21 foram machos (52,38%) e 10/21 foram fêmeas (47,61%), com idade entre 2 e 16 anos (média de 8.42 anos +/- 4.23 anos), peso entre 1,2 e 30kg (média de 13.22kg +/- 10.65kg) e raças variadas: sem raça definida 10/21 (47,61%), Teckel 2/21 (9,52%), Pastor Alemão 2/21 (9,52%), Poodle 2/21 (9,52%), Pinscher 1/21 (4,76%), Labrador 1/21 (4,76%), Maltês 1/21 (4,76%), Pug 1/21 (4,76%), Yorkshire Terrier 1/21 (4,76%). Foram analisadas 7 amostras de LCE (33,33%).

O GC foi formado por 8/10 fêmeas (80%) e 2/10 machos (20%), com idade entre 1 e 16 anos (média de 8.2 anos +/- 5.59 anos), peso entre 6 a 30kg (média de 12.7kg +/- 8.89kg) e de raças variadas: Lhasa Apso 3/21 (30%), Poodle 2/21 (20%), Pastor Alemão 2/21 (20%), Chow Chow 1/21 (10%), Husky Siberiano 1/21 (10%), SRD 1/21 (10%).

Foram realizadas 31 mensurações de GFAP no soro (21 do GE e 10 do GC) e 7 mensurações no LCE. Os valores mensurados da densidade óptica (DO) foram obtidos e posteriormente transformados em valores com unidades em ng/ml.

Foi observado aumento dos valores séricos de GFAP de 6/21 animais do GD enquanto que no GC nenhum animal apresentou elevação do biomarcador acima do ponto de corte. A média dos valores séricos

de GFAP do do GD foi de 2.49 ng/ml com desvio padrão de +/- 4.38 ng/ml, enquanto que no GC a média foi de 0.11 ng/ml, com desvio padrão de +/- 0.34 ng/ml. Os valores de GFAP sérica do grupo controle estão ilustrados no quadro 1.

Até o momento não há estudos consistentes que confirmam os valores de referência para o biomarcador mensurado no soro e LCE de cães. Em humanos sabe-se que em condições fisiológicas não ocorre a expressão da proteína a níveis detectáveis em fluidos biológicos (soro, plasma, LCE e urina), devido à integridade celular dos astrócitos em indivíduos saudáveis e à especificidade da proteína como biomarcador na presença de lesão cerebral (FOERCH et al., 2012; PELINKA et al., 2004; ZUREK, FEDORA, 2012). Infere-se com os resultados deste estudo que a GFAP seja também liberada em cães apenas na presença de danos às células da glia e possa ser utilizada como um biomarcador de lesão cerebral.

**Quadro 1.** Raça, peso, idade e valores séricos de GFAP nos cães do grupo controle (GC).

ANIMAL	RAÇA	IDADE (ANOS)	PESO (KG)	GFAP-SORO (NG/ML)
1	Poodle	16	7,5	0
2	Lhasa Apso	5	6	0
3	Husky Siberiano	1	16	0
4	Poodle	16	6,5	0
5	Lhasa Apso	7	6	0
6	SRD	10	7	0
7	Pastor Alemão	1	25	0
8	Lhasa Apso	9	6	0
9	Chow Chow	4	17	1,105263*
10	Pastor Alemão	13	30	0

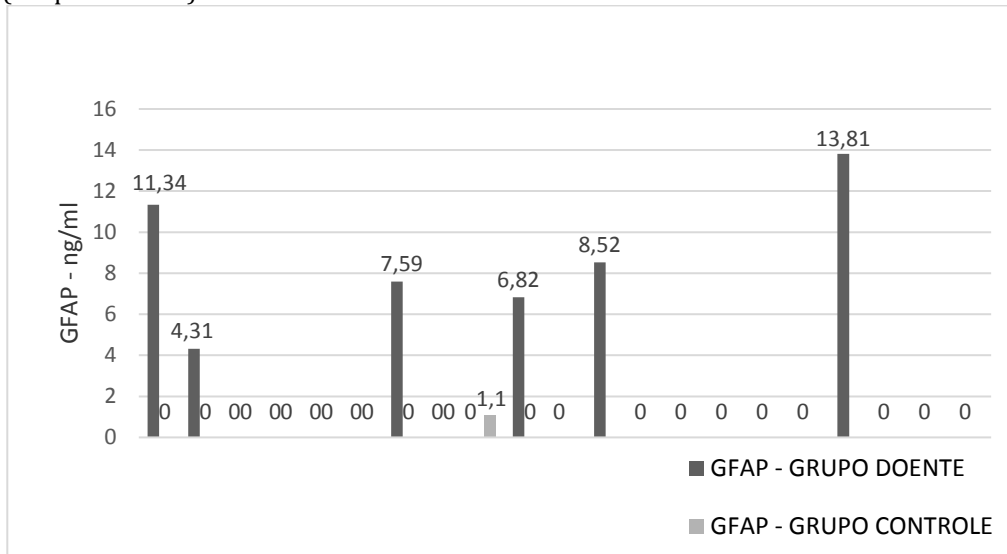
Fonte: Própria autora.

Após o diagnóstico neuroanatômico, observou-se que 13 cães apresentaram síndrome multifocal (61,9%), seis cães síndrome cerebral (28,6%), um cão síndrome cerebelar (4,75%) e um cão síndrome vestibular central (4,75%). Os níveis séricos de GFAP não apresentaram correlação com a localização da lesão neste estudo, porém há a possibilidade de o nível do biomarcador aumentar conforme gravidade e a extensão da lesão, mesmo que seja focal (FRASER et al., 2011).

Foi observado que os animais com tempo de evolução da doença de até 5 dias, apresentaram a concentração sérica de GFAP igual a zero. Foi considerada a data de início do quadro clínico aquela relatada pelo guardião na anamnese da primeira consulta até a data da colheita das amostras biológicas. Cães com o tempo de evolução variando de cinco a sete dias e com 15 dias, apresentaram valores séricos aumentados do biomarcador. Nesse estudo ficou evidente o aumento gradativo GFAP, o qual ocorreu usualmente após quatro dias de lesão encefálica, sendo que os picos de GFAP ocorreram entre os dias 5 e 7 e dia 15, sugerindo, portanto, que nos cães com alterações neurológicas centrais a expressão da proteína no soro ocorra mais tardiamente do que nos humanos. Contrapondo assim os resultados de Pelinka et al. (2004) e de Mörtberg et al. (2011) que mostraram através de seus estudos o rápido aumento da GFAP em humanos após lesões encefálicas graves. 8/21 (38,1%) cães não receberam corticosteroide previamente à colheita da amostra de soro e/ou LCE, enquanto que 13/21 (61,9%) cães receberam, em sua maioria um dia antes da obtenção da amostra. Não foi observado melhora dos sinais clínicos em nenhum dos pacientes após o início do corticosteroide até o dia da colheita da amostra biológica (soro e LCE).

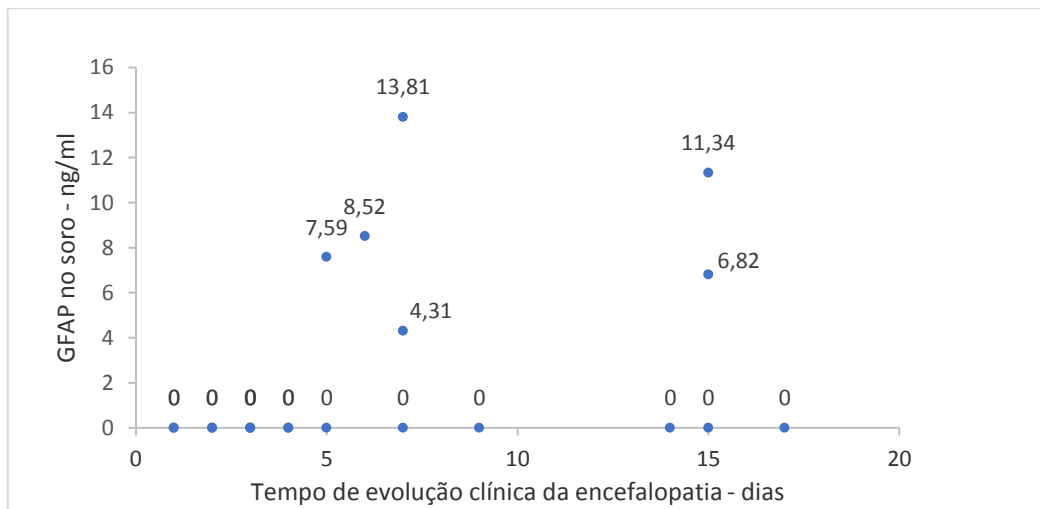
O aumento da GFAP foi notório nos animais com mais de cinco dias de sintomatologia neurológica, independente do uso prévio ou não de corticosteroide. O tempo de evolução clínica da lesão pode ser um dos importantes fatores a influenciar nas concentrações do biomarcador no soro e no LCE. Por outro lado, nos cães do GD em que a GFAP foi mensurada num período inferior a 48 horas de início dos sinais verificou-se que a maioria não expressou a referida proteína em quantidades detectáveis no soro, reforçando a hipótese de que há uma associação positiva entre tempo de lesão e expressão da GFAP em fluidos corporais. Os aspectos clínicos dos pacientes, tempo de evolução da doença e os resultados séricos da GFAP do GD estão representados no gráfico 1 e 2 e no quadro 2 respectivamente.

**Gráfico 1** - Concentrações séricas de GFAP de 21 cães com encefalopatias (Grupo Doente) e 10 cães hígdios (Grupo Controle).



Fonte: própria autora.

**Gráfico 2** - Valores de GFAP sérica em 21 cães com encefalopatias em relação ao tempo de evolução dos sinais clínicos de lesão encefálica.



Fonte: Própria autora.

**Quadro 2:** Aspectos clínicos e concentrações séricas de GFAP em cães do grupo doente (GD).

Tempo de evolução (dias)	Animal	GFAP – soro (ng/ml)	GFAP – LCE (ng/ml)	Idade (anos)	Peso (Kg)	Raça	Localização da lesão	Uso de corticosteroide previamente à colheita da amostra	Tempo de uso de corticosteroide (dias)	Diagnóstico/Etiologia
1	19	0	NM	8	11	SRD	Síndrome Cerebral (Tálamo-Cortical)	S (Dexametasona)	1	Desconhecido
1	21	0	NM	9	10	SRD	Síndrome Cerebral (Tálamo-Cortical)	S (Dexametasona)	6	Neoplasia
2	9	0	NM	2	10	SRD	Síndrome Cerebral (Tálamo-Cortical)	S (Dexametasona)	1	Desconhecido
2	15	0	0	10	26	SRD	Síndrome multifocal (Tálamo-Cortical e tronco encefálico)	S (Dexametasona)	1	Desconhecido
3	5	0	NM	10,2	6	SRD	Síndrome Multifocal (Tálamo-córtex e tronco encefálico)	S (Prednisona)	1	Desconhecido
3	17	0	NM	2	30	Pastor Alemão	Síndrome Multifocal (tálamo-córtex e tronco encefálico)	S (Dexametasona)	1	Desconhecido
3	3	0	NM	8	2,3	Pinscher	Síndrome Multifocal (tálamo-cortical, cerebelar, vestibular e II, VII e VIII par de NC)	S (Prednisolona)	20	Desconhecido
4	6	0	NM	13	9	Teckel	Síndrome Multifocal (vestibular e tálamo-cortical)	S (Prednisolona)	5	Desconhecido
4	16	0	2,52	9	2,6	Maltês	Síndrome Multifocal (cerebelar e tronco encefálico)	N	-	Desconhecido
5	4	0	NM	16	8,9	Teckel	Síndrome Multifocal (vestibular central e medular lombo-sacra)	N	-	Neoplasia
5	7	7,59	NM	6	5,3	SRD	Síndrome cerebelar	N	-	Desconhecido
6	12	8,52	0	14	29	Pastor Alemão	Síndrome Vestibular central	S (Prednisona)	1	Desconhecido
7	2	4,31	NM	10	21	SRD	Síndrome Multifocal (vestibular central e medular toraco-lombar)	N	-	Toxoplasmose
7	18	13,81	NM	4	26,5	SRD	Síndrome Multifocal (tronco encefálico e medular toraco-lombar)	S (Dexametasona)	1	Toxoplasmose
7	20	0	58,71	11	1,2	Yorkshire Terrier	Síndrome Cerebral (Tálamo-Cortical)	S (Dexametasona)	1	Desconhecido
9	13	0	55,39	4	4,5	Poodle	Síndrome multifocal (Cerebelar e tálamo-cortical)	S (Dexametasona)	1	Desconhecido
14	11	0	0	5	28	SRD	Síndrome Multifocal (vestibular central, II, VIII e IX pares de NC)	S (Prednisona)	1	Desconhecido
15	1	11,34	NM	11	30	Labrador	Síndrome Multifocal (tálamo-cortical, tronco encefálico e medular lombo-sacra)	S (Dexametasona)	1	Desconhecido
15	8	0	NM	3	5,4	Pug	Síndrome Multifocal (Tálamo-Córtex e tronco encefálico)	S (Dexametasona)	1	Desconhecido
15	10	6,82	NM	16	4,0	Poodle	Síndrome Cerebral (Tálamo-Cortical)	N	-	Desconhecido
17	14	0	114,86	12	3,0	SRD	Síndrome cerebral (Prosencefalo)	N	-	Desconhecido

NM: não mensurado. S: sim. N: não.

Fonte: própria autora

Em 7 cães foi possível analisar os níveis do biomarcador no soro e no LCE concomitantemente. A análise do LCE foi realizada em seis das sete amostras colhidas nos cães do GD que apresentaram condições clínicas favoráveis ao procedimento de colheita do LCE e evidenciou em sua maioria, sinais de inflamação, sem presença de bactérias. Todas as culturas bacteriológicas e fúngicas de LCE foram negativas (Quadro 3).

**Quadro 3.** Análise de 6 amostras de LCE de cães com encefalite atendidos no HV-Uel entre 2016 e 2017.

ANIMAL	11	12	13	14	15	20
<b>COR</b>	Incolor	Incolor	Xantocrômica	Incolor	Incolor	Incolor
<b>ASPECTO</b>	Límpido	Límpido	Turvo	Ligeiramente turvo	Límpido	Límpido
<b>GLICOSE</b>	72 mg/dl	67 mg/dl	58 mg/dl	45 mg/dl	55 mg/dl	48 mg/dl
<b>PROTEÍNA</b>	69 mg/dl	22,3 mg/dl	24,3 mg/dl	650,1 mg/dl	348,6 mg/dl	63 mg/dl
<b>DENSIDADE</b>	1004	1002	1006	1012	1008	1006
<b>LEUCÓCITOS</b>	3/mm <sup>3</sup>	Ausentes	24/mm <sup>3</sup>	507/mm <sup>3</sup>	442/mm <sup>3</sup>	2/mm <sup>3</sup>
<b>HEMÁCIAS</b>	15/mm <sup>3</sup>	Ausentes	61/mm <sup>3</sup>	1/mm <sup>3</sup>	39/mm <sup>3</sup>	592/mm <sup>3</sup>
<b>BACTÉRIAS</b>	Ausentes	Ausentes	Ausentes	Ausentes	Ausentes	Ausentes
<b>SEGMENTADOS</b>		---	57%	22%	40%	---
<b>LINFÓCITOS</b>	---	---	28%		37%	---
<b>MONÓCITOS</b>	---	---	15%	78%	23%	---
<b>BASTONETES</b>	---	---	---	---	---	---
<b>OBSERVAÇÃO</b>	---	---	---	Macrófagos espumosos	---	---

Fonte: Própria autora.

Os valores mensurados no LCE foram maiores que os valores mensurados no soro quando comparados no mesmo indivíduo, e 4 das 7 amostras de LCE foram positivas, com valores muito elevados após 7 dias de evolução da lesão encefálica. A média dos valores de GFAP mensurados no LCE foi 33.07 ng/ml +/- 44.83 ng/ml, média superior à obtida no soro desses animais com encefalite.

Esses dados resultaram em uma maior sensibilidade para o LCE em comparação com o soro, concordando com os resultados de estudos anteriores e reforçando que a proximidade do LCE com o cérebro pode ser um fator importante para a maior sensibilidade da amostra na mensuração de biomarcadores (COSTA; GAGO; GARRETT, 2011).

As concentrações de GFAP no soro e no LCE e tempo de evolução da doença podem ser comparadas no quadro 4.

**Quadro 4.** Concentrações de GFAP no soro e no LCE de 7 cães com encefalite atendidos em um hospital escola em Londrina, 2017.

TEMPO DE EVOLUÇÃO DA ENCEFALITE - DIAS	ANIMAL	GFAP - LCE	GFAP - SORO
2	15	0	0
4	16	2,52	0
6	12	0	8,52
7	20	58,71	0
9	13	55,39	0
14	11	0	0
17	14	114,86	0

Fonte: própria autora.

Alterações hematológicas nem sempre ocorrem no paciente com sinais neurológicos, porém tais exames são fundamentais em todos os casos (TAYLOR, 2015). 13/21 (61,9%) cães apresentaram alterações leucocitárias, enquanto que 8/21 (38%) apresentaram leucograma normal. 8/21 (38%) cães desenvolveram anemia e 4/21 (19%) desenvolveram trombocitopenia.

Foram realizados exames sorológicos e moleculares para obter o possível diagnóstico nos pacientes do GD: quatro PCR's para o *Vírus da Cinomose Canina* (sendo um positivo e três negativos); 13 sorologias para *Toxoplasma gondii* (sendo três positivos e 10 negativos); 13 sorologias para *Neospora caninum* (todas negativas); cinco PCR's para *Erlichia canis* (sendo um positivo e quatro negativos); cinco PCR's para *Babesia canis* (sendo um positivo e quatro negativos) e quatro PCR's para *Anaplasma platys* (todos negativos). Perante a negatividade dos exames verifica-se pouca chance de ocorrência de encefalites por protozoários e/ou hemoparasitas mais comuns presentes na região em que o estudo foi realizado.

Após 12 meses de estudos verificou-se que apenas 5 cães do GD (23,8%) estão vivos até o momento, o que demonstra que as encefalites ocasionam uma alta taxa de mortalidade (76,2%). Todos os cães do GD que vieram a óbito durante o estudo apresentaram a GFAP elevada, reforçando que o biomarcador pode fornecer uma previsão da evolução clínica e auxiliar no prognóstico. Quanto aos cães do GD que tiveram valores de GFAP igual a zero, há a possibilidade de a amostra ter sido colhida no momento em que não houve ainda o pico de elevação do biomarcador.

Algumas limitações influenciaram nos resultados deste estudo: não ter controlado a variável tempo (cada paciente com um tempo diferente de evolução clínica da doença e as amostras biológicas colhidas em diferentes momentos), ter uma única mensuração do biomarcador para cada paciente, diversas etiologias como doença de base da encefalopatia e impossibilidade de obtenção de amostras de LCE de todos os pacientes do GD.

Após a avaliação estatística, o p-valor resultante da análise das médias de GFAP no soro do GD e do GC foi de 0.1942, não rejeitando-se  $H_0$ , ou seja, as médias dos grupos (GD e GC) não diferem entre si estatisticamente, sendo necessária uma análise estatística descritiva dos resultados do estudo, devido aos dados não possuírem uma distribuição Normal. Isso ocorre devido à grande quantidade de amostras com valores igual a zero.

### CONCLUSÃO

Conclui-se neste estudo que cães com sinais neurológicos centrais podem apresentar elevações nos valores de GFAP tanto no LCE quanto no soro quando comparados com cães saudáveis. O LCE parece ser mais sensível que o soro na detecção precoce da GFAP de cães com encefalopatias. Assim, a GFAP pode ser

utilizada como biomarcador de lesão encefálica. Deve-se considerar o fator subjetivo em relação ao relato dos proprietários no que se refere a tempo de evolução da doença. Admite-se também que o kit ELISA NS830 destinado para o uso humano, pode ser utilizado em cães com confiabilidade, ressaltando que todos os testes possuem limitações.

## REFERÊNCIAS

- COSTA, A. G.; GAGO, M. F.; GARRET, C. Biomarcadores no líquido cefalorraquidiano para o diagnóstico precoce de doença de parkinson. **Acta Médica Portuguesa**, Lisboa, v. 24, n. S4, p. 761-768, 2011.
- DAMIANI, D.; LAUDANNA, N.; SANCHES, R.; BORELLI, N. S.; DAMIANI, D. Encefalopatias: etiologia, fisiopatologia e manuseio clínico de algumas das principais formas de apresentação da doença. **Revista Brasileira de Clínica Médica**, São Paulo, v. 1, p. 67-74, jan./mar. 2013.
- ELIAS, B. C. **Comparação dos valores séricos de enolase neuronal específica (NSE) em cães com e sem encefalite**. 2016. 63f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade Estadual de Londrina, 2016.
- FERNÁNDEZ, V. L.; BERNARDINI, M. **Neurologia em cães e gatos**. São Paulo: MedVet, 2010.
- FOERCH, C.; NIESSNER, M.; BACK, T.; BAUERLE, M.; MARCHIS, G. M.; FERBERT, A.; GREHL, H.; HAMANN, G. F.; JACOBS, A.; KASTRUP, A.; KLIMPE, S.; PALM, F.; THOMALLA, G.; WORTHMANN, H.; SITZER, M. Diagnostic accuracy of plasma glial fibrillary acidic protein for differentiating intracerebral hemorrhage and cerebral ischemia in patients with symptoms of acute stroke. **Clinical Chemistry**, Baltimore, v. 58, n. 1, p. 237-245, 2012.
- LEI, J.; GAO, G.; FENG, J.; JIN, Y.; WANG, C.; MAO, Q.; JIANG, J. Glial fibrillary acidic protein as a biomarker in severe traumatic brain injury patients: a prospective cohort study. **Critical Care**, London, v. 19, p. 362, Oct. 2015.
- LENZ, G. **Efeito da lesão com ácido cálcico sobre a fosforilação e o imunocontéudo da Proteína Glial Fibrilar Ácida em hipocampo de ratos**. 1996, 74f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) - Universidade Federal do Rio grande do Sul, Porto Alegre, 1996.
- MIYAKE, H.; INOUE, A.; TANAKA, M.; MATSUKI, N. Serum Glial Fibrillary Acidic Protein as a Specific Marker for Necrotizing Meningoencephalitis in Pug Dogs. **Journal of Veterinary Medical Science**, Tokyo, v. 75, n. 11, p. 1543-1545, July 2013.
- NISHIDA, H.; NAKAYAMA, M.; TANAKA, H.; KAMISHINA, H.; IZAWA, T.; HATOYA, S.; SUGIURA, K.; SUZUKI, Y.; IDE, C.; INABA, T. Evaluation of serum phosphorylated neurofilament subunit nf-h as a prognostic biomarker in dogs with thoracolumbar intervertebral disc herniation. **Veterinary Surgery**, Philadelphia, v. 43, p. 289-293, 2014.
- PELINKA, L. E.; KROEPFL, A.; SCHMIDHAMMER, R.; KRENN, M.; BUCHINGER, W.; REDL, H.; RAABE, A. Glial fibrillary acidic protein in serum after traumatic brain injury and multiple trauma. **The Journal of Trauma**, Baltimore, v. 57, p. 1006-11012, Nov. 2004.
- RECH, H. T.; VIEIRA, S. R. R.; NAGEL, F.; BRAUNER, J. S.; SCALCO, R. Serum neuron-specific enolase as early predictor of outcome after in-hospital cardiac arrest: a cohort study. **Critical Care**, United States, v. 10, n. 5. Sep 2006.
- SATO, Y.; SHIMAMURA, S.; MASHITA, T.; KOBAYASHI, S.; OKAMURA, Y.; KATAYAMA, M.; KAMISHINA, H.; SATO, R.; UZUKA, Y.; YASUDA, J. Serum glial fibrillary acidic protein as a diagnostic biomarker in dogs with progressive myelomalacia. **Journal of Veterinary Medical Science**, Tokyo, v. 75, n. 7, p. 949-953, Mar. 2013.
- TAYLOR, S. M. Doenças neuromusculares. In: NELSON, R. W.; COUTO, C. G. **Medicina interna de pequenos animais**. 5. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2015. p. 966-1047.

TODA, Y.; MATSUKI, N.; SHIBUYA, M.; FUJIOKA, I.; TAMAHARA, S.; ONO, K. Glial fibrillary acidic protein (GFAP) and anti-GFAP autoantibody in canine necrotising meningoencephalitis. **The Veterinary Record**, London, v. 161. p. 261-264, Aug. 2007.

ZUREK, J.; FEDORA, M. The usefulness of S100B, NSE, GFAP, NF-H, secretagogin and Hsp70 as a predictive biomarker of outcome in children with traumatic brain injury. **Acta Neurochirurgica**, Wien, AT, v. 154, p. 93-103, 2012.

#### **4 CONCLUSÃO**

Conclui-se neste estudo que cães com sinais neurológicos centrais podem apresentar elevações nos valores de GFAP tanto no LCE quanto no soro quando comparados com cães saudáveis. O LCE parece ser mais sensível que o soro na detecção precoce da GFAP de cães com encefalopatias. Assim, a GFAP pode ser utilizada como biomarcador de lesão encefálica. Deve-se considerar o fator subjetivo em relação ao relato dos proprietários no que se refere a tempo de evolução da doença. Admite-se também que o kit ELISA NS830 destinado para o uso humano, pode ser utilizado em cães com confiabilidade, ressaltando que todos os testes possuem limitações.

## REFERÊNCIAS

- ANDRADE NETO, J. P. Doenças do encéfalo. In: JERICÓ, M. M.; ANDRADE NETO, J. P.; KOGIKA, M. M. **Tratado de medicina interna de cães e gatos**. Rio de Janeiro: Roca, 2015a. p. 2047-2108.
- ANDRADE NETO, J. P. Eletroencefalografia. In: JERICÓ, M. M.; ANDRADE NETO, J. P.; KOGIKA, M. M. **Tratado de medicina interna de cães e gatos**. Rio de Janeiro: Roca, 2015b. p. 2033.
- ANDRADE NETO, J. P. Exame neurológico em cães e gatos. In: JERICÓ, M. M.; ANDRADE NETO, J. P.; KOGIKA, M. M. **Tratado de medicina interna de cães e gatos**. Rio de Janeiro: Roca, 2015c. p. 2001-2013.
- CARVALHO, C. F. Ecoencefalografia e ultrassonografia doppler transcraniana. In: JERICÓ, Marcia M.; ANDRADE NETO, João Pedro; KOGIKA, Marcia Mery. **Tratado de medicina interna de cães e gatos**. Rio de Janeiro: Roca, 2015. p. 2028-2032.
- COSTA, A. G.; GAGO, M. F.; GARRET, C. Biomarcadores no líquido cefalorraquidiano para o diagnóstico precoce de doença de parkinson. **Acta Médica Portuguesa**, Lisboa, v. 24, n. S4, p. 761-768, 2011.
- DAMIANI, D.; LAUDANNA, N.; SANCHES, R.; BORELLI, N. S.; DAMIANI, D. Encefalopatias: etiologia, fisiopatologia e manuseio clínico de algumas das principais formas de apresentação da doença. **Revista Brasileira de Clínica Médica**, São Paulo, v. 1, p. 67-74, jan./mar. 2013.
- DE LAHUNTA, A; GLASS, E. **Veterinary neuroanatomy and clinical neurology**. 3. ed. St. Louis, Missouri, Elsevier, 2009. Cap.14, 17, 20 .
- DEWEY, C. W.; COSTA, R. C.; DUCOTÉ, J. M. Neurodiagnostics. In: DEWEY, C. W.; COSTA, R. C. **Practical guide to canine and feline neurology**. 3. ed. Ames, Iowa, USA: Wiley Blackwell, 2016. p. 61 - 83.
- DIOGO, C. C.; CAMASSA, J. A. de A. Síndrome vestibular central de causa bacteriana em cão: Revisão de literatura. **Revista Científica de Medicina Veterinária**, Garça, Ano XIII, n. 25, jul 2015.
- ELIAS, B. C. **Comparação dos valores séricos de enolase neuronal específica (NSE) em cães com e sem encefalite**. 2016. 63f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade Estadual de Londrina, 2016.
- FERNÁNDEZ, V. L.; BERNARDINI, M. **Neurologia em cães e gatos**. São Paulo: MedVet, 2010.
- FOERCH, C.; NIESSNER, M.; BACK, T.; BAUERLE, M.; MARCHIS, G. M.; FERBERT, A.; GREHL, H.; HAMANN, G. F.; JACOBS, A.; KASTRUP, A.; KLIMPE, S.; PALM, F.; THOMALLA, G.; WORTHMANN, H.; SITZER, M. Diagnostic accuracy of plasma glial fibrillary acidic protein for differentiating intracerebral hemorrhage and cerebral ischemia in patients with symptoms of acute stroke. **Clinical Chemistry**, Baltimore, v. 58, n. 1, p. 237-245, 2012.

FRASER, D. D.; CLOSE, T. E.; ROSE, K. L.; WARD, R.; MEHL, M.; FARRELL, C.; LACROIX, J.; CREERY, D.; KESSELMAN, M.; STANIMIROVIC, D.; HUTCHISON, J. S. Severe traumatic brain injury in children elevates Glial fibrillary acidic protein in cerebrospinal fluid and serum. **Pediatric Critical Care Medicine**, v. 12, n. 3, 2011.

GREENE, C. E.; APPEL, M. J. Canine Distemper. In: GREENE, C. E. **Infectious diseases of the dog and cat**. 3. ed. St. Louis, Missouri: Elsevier, 2006. p. 25-35.

GRIFFITHS, I. R. The extensive Myelopathy of intervertebral disc protrusions in dogs (“the ascending syndrome”). **Journal of Small Animal Practice**, 13: 425-438, 1972.

HIGGINBOTHAM, M. J.; KENT, M.; GLASS, E. N. Noninfectious inflammatory central nervous system diseases in dogs. **Compendium Continuing Education Veterinary**, United States, v. 29, n. 8, p. 488-501, 2007.

KEWAL, K. Jain. **The Handbook of Biomarkers**. New York: Springer, 2010. P. 1-10.

KEWAL, K. Jain. Personalized management of neurological disorders. In: KEWAL, K. J. **Textbook of personalized medicine**. 2. ed. New York: Springer, 2015a. p. 409-418.

KEWAL, K. Jain. Role of biomarkers in personalized medicine. In: KEWAL, K. J. **Textbook of personalized medicine**. 2. ed. New York: Springer, 2015b. p. 91.

LEI, J.; GAO, G.; FENG, J.; JIN, Y.; WANG, C.; MAO, Q.; JIANG, J. Glial fibrillary acidic protein as a biomarker in severe traumatic brain injury patients: a prospective cohort study. **Critical Care**, London, v. 19, p. 362, Oct. 2015.

LENZ, G. **Efeito da lesão com ácido cáinico sobre a fosforilação e o imunoconteúdo da Proteína Glial Fibrilar Ácida em hipocampo de ratos**. 1996, 74f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) - Universidade Federal do Rio grande do Sul, Porto Alegre, 1996.

MAIORKA, P. C. Histopatologia do sistema nervoso. In: JERICÓ, M. M.; ANDRADE NETO, J. P.; KOGIKA, M. M. **Tratado de medicina interna de cães e gatos**. Rio de Janeiro: Roca, 2015. p. 2041-2046.

MATSUKI, N.; FUJIWARA, K.; TAMAHARA, S.; UCHIDA, K.; MATSUNAGA, S.; NAKAYAMA, H.; DOI, K.; OGAWA, H.; ONO, K. Prevalence of autoantibody in cerebrospinal fluids from dogs with various CNS diseases. **Journal of Veterinary Medical Science**, Tokyo, v. 66, n. 3, p. 295-297, 2004.

MÖRTBERG, E.; ZETTERBERG, H.; NORDMARK, J.; BLENNOW, K.; ROSENGREN, L.; RUBERTSSON, S. S-100 is superior to NSE, BDNF and GFAP in predicting outcome of resuscitation from cardiac arrest with hypothermia treatment. **Resuscitation**, Ireland, v. 82, p. 26-31, 2011.

NISHIDA, H.; NAKAYAMA, M.; TANAKA, H.; KAMISHINA, H.; IZAWA, T.; HATOYA, S.; SUGIURA, K.; SUZUKI, Y.; IDE, C.; INABA, T. Evaluation of serum phosphorylated neurofilament subunit nf-h as a prognostic biomarker in dogs with thoracolumbar intervertebral disc herniation. **Veterinary Surgery**, Philadelphia, v. 43, p. 289-293, 2014.

PELINKA, L. E.; KROEPFL, A.; SCHMIDHAMMER, R.; KRENN, M.; BUCHINGER, W.; REDL, H.; RAABE, A. Glial fibrillary acidic protein in serum after traumatic brain injury and multiple trauma. **The Journal of Trauma**, Baltimore, v. 57, p. 1006-11012, Nov. 2004.

PRADA, I. L. S. Anatomia do sistema nervoso do cão e do gato. In: JERICÓ, M. M.; ANDRADE NETO, J. P.; KOGIKA, M. M. **Tratado de medicina interna de cães e gatos**. Rio de Janeiro: Roca, 2015. p. 1972–2000.

RADAELLI, S. T.; PLATT, S. R. Bacterial meningoencephalomyelitis in dogs: a retrospective study of 23 Cases (1990-1999). **Journal Veterinary Internal Medicine**, Philadelphia, v. 16, p. 159-163, 2002.

RECH, H. T.; VIEIRA, S. R. R.; NAGEL, F.; BRAUNER, J. S.; SCALCO, R. Serum neuron-specific enolase as early predictor of outcome after in-hospital cardiac arrest: a cohort study. **Critical Care**, United States, v. 10, n. 5. Sep 2006.

SATO, Y.; SHIMAMURA, S.; MASHITA, T.; KOBAYASHI, S.; OKAMURA, Y.; KATAYAMA, M.; KAMISHINA, H.; SATO, R.; UZUKA, Y.; YASUDA, J. Serum glial fibrillary acidic protein as a diagnostic biomarker in dogs with progressive myelomalacia. **Journal of Veterinary Medical Science**, Tokyo, v. 75, n. 7, p. 949-953, Mar. 2013.

SCHATZBERG, S.; NGHIEM, P. Infectious and inflammatory diseases of the CNS. In: PLATT, S.; GAROSI, L. **Small animal neurological emergencies**. London: Manson Publishing, 2012. p. 341-362.

SCHRIEFER, A.; CARVALHO, E. M. Biomarcadores em medicina. **Gazeta Médica da Bahia**, Salvador, v. 78, n. 1, p. 47–51, 2008.

SHAFIE, I. N. F.; ANDERSON, T. J.; PENDERIS, J.; ECKERSALL, P. D.; McLAUGHLIN, M. A protocol for the management of canine cerebrospinal fluid for the proteomic assessment of putative biomarkers. **The Veterinary Journal**, London, v. 197, p. 836-841, 2013.

SOILA, R. Análise do líquido cefalorraquidiano. In: JERICÓ, M. M.; ANDRADE NETO, J. P.; KOGIKA, M. M. **Tratado de medicina interna de cães e gatos**. Rio de Janeiro: Roca, 2015. p. 2014-2023.

TAYLOR, S. M. Doenças neuromusculares. In: NELSON, R. W.; COUTO, C. G. **Medicina interna de pequenos animais**. 5. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2015. p. 966-1047.

TIPOLD, A. Treatment of primary central nervous system inflammation (encephalitis and meningitis). In: BONAGURA, J. D.; TWEDT, David C. **Kirk's current veterinary therapy XIV**. St. Louis, Missouri: Saunders Elsevier, 2009. Chapter 233.

TODA, Y.; MATSUKI, N.; SHIBUYA, M.; FUJIOKA, I.; TAMAHARA, S.; ONO, K. Glial fibrillary acidic protein (GFAP) and anti-GFAP autoantibody in canine necrotising meningoencephalitis. **The Veterinary Record**, London, v. 161. p. 261-264, Aug. 2007.

TRENCHESKA, O.; ALEKOVCKI, V.; NEDELKOV, D.; STOJANOSKI, K. Developing Novel methods for protein analysis and their potential implementation in diagnosing neurological diseases. In: CHEN, K.-S. (Ed.). **Advanced Topics in Neurological Disorders**. Croatia, 2012. p. 129-130.

WIESMANN, M.; STEINMEIER, E.; MAGERKURTH, O.; LINN, J.; GOTTMANN, D.; MISSLER, U. Outcome prediction in traumatic brain injury: comparison of neurological status, CT findings, and blood levels of S100B and GFAP. **Acta Neurologica Scandinavica**, v. 121, p. 178-185, 2010.

YANG, Z.; BRAMLETT, H. M.; MOGHIEB, A.; YU, D.; WANG, P.; LIN, F.; BAUER, C.; SELIG, T. M.; JAALOUK, E.; WEISSMAN, A. S.; RATHORE, D. S.; ROMO, P.; ZHANG, Z.; HAYES, R. L.; WANG, M. Y.; DIETRICH, W. D.; WANG, K. K. W. Temporal profile and severity correlation of a panel of rat spinal cord injury protein biomarkers. **Molecular Neurobiology** Clifton, NJ. 13 Mar. 2017. <https://doi.org/10.1007/s12035-017-0424-7>.

ZENAIDE, P. V.; FLORES, D. G. Biomarkers in septic encephalopathy: a systematic review of clinical studies. **Revista Brasileira de Terapia Intensiva**, São Paulo, v. 25. n. 1, p. 56-62, 2013.

ZETTERBERG, H.; MORRIS, H. R.; HARDY, J.; BLENNOW, K. Update on fluid biomarkers for concussion. **Concussion**, New York, v. 1, n. 3, 2016.

ZUREK, J.; FEDORA, M. The usefulness of S100B, NSE, GFAP, NF-H, secretagogin and Hsp70 as a predictive biomarker of outcome in children with traumatic brain injury. **Acta Neurochirurgica**, Wien, AT, v. 154, p. 93-103, 2012.

**APÊNDICE**

## APÊNDICE A

Termo de ciência e autorização para participação do paciente na pesquisa

### TERMO DE CIÊNCIA E AUTORIZAÇÃO

Eu \_\_\_\_\_, RG: \_\_\_\_\_, CPF: \_\_\_\_\_ responsável pelo animal \_\_\_\_\_, RG-HV: \_\_\_\_\_/\_\_\_\_\_, que está internado no setor \_\_\_\_\_ do HV-UEL, autorizo a participação do meu animal no projeto de pesquisa intitulado “Comparação dos níveis de GFAP no soro de cães com e sem encefalite”, sob coordenação do pesquisador da Universidade Estadual de Londrina que assina abaixo. Fui esclarecido sobre os objetivos do projeto, que são: Comparar níveis séricos de GFAP em cães com e sem encefalite.

Também fui esclarecido quanto aos procedimentos a serem empregados e suas possíveis consequências sobre o animal, os quais serão:

Os pacientes serão submetidos a exames físico e neurológico, coleta de amostras de sangue para exames de rotina já solicitados pelo clínico e com auxílio de equipe treinada, sem oferecer riscos e sofrimento ao animal e para a dosagem da GFAP.

Procedimentos como aferição da pressão arterial, glicemia, oximetria de pulso, escala de Glasgow modificada, exames físico e neurológico, e hemogasometria poderão ser realizados de forma seriada conforme a necessidade clínica do paciente.

Quando necessário será solicitada a coleta de líquido cérebro espinhal (LCE) com o animal sob contenção química com anestesia geral. O material coletado será aproveitado para análises da pesquisa. Neste caso a anestesia será realizada por profissionais especializados do setor de anestesiologia do HV-UEL.

Tenho conhecimento de que os resultados obtidos serão divulgados exclusiva e anonimamente em publicações científicas; e de que tenho o direito e a liberdade de suspender essa autorização a qualquer momento que julgue necessário.

Londrina, \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_.

---

Assinatura do responsável pelo animal

---

Prof. Lucas Alécio Gomes  
 Coordenador do projeto e orientador  
 Centro de Ciências Agrárias / Departamento de Clínicas Veterinárias  
 Universidade Estadual de Londrina - UEL  
 (43) 3371-4339 / 3371-4269 / 3371-4066

**ANEXO**

## ANEXO A

### Aprovação do projeto de pesquisa pelo comitê de ética no uso de animais da UEL (CEUA-UEL).



Universidade  
Estadual de Londrina

#### COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

OF. CIRC. CEUA Nº 216/2016

Londrina, 03 de Outubro de 2016.

Prezado Pesquisador,


Certificamos que o projeto intitulado "Comparação dos níveis de GFAP no soro de cães com e sem encefalite", protocolo CEUA nº 17355.2016.05, sob a responsabilidade de **Lucas Alécio Gomes**, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino), encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794 de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 16 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), foi **aprovado** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Londrina (CEUA/UEL), em reunião realizada em **20/09/2016**.

O objetivo do projeto é comparar os níveis séricos de GFAP em cães com e sem encefalite. Os animais serão submetidos a exames físico e neurológico diariamente durante o tempo de internação. Exames laboratoriais serão solicitados conforme a necessidade clínica de cada paciente, porém a dosagem de GFAP será realizada em todos os pacientes em estudo. Cf. 2.

Vigência do Projeto	22/08/2016 a 22/08/2017
Espécie/inagem	Cão / Variável
Nº de animais	60
Peso/idade	>3kg / Variável
Sexo	Machos e Fêmeas
Origem	Hospital Veterinário / UEL
Amostras a serem colhidas	Sangue

Cumpra-se orientar que caso pretendam-se quaisquer alterações no protocolo experimental aprovado, deve-se submeter o novo protocolo a apreciação da CEUA/UEL anteriormente à execução das modificações.

Coloco-me à disposição para quaisquer esclarecimentos que se fizerem necessários. Sem mais para o momento, subscrevo, cordialmente,

  
 Profa. Dra. Claura Scantamburlo Alves Fernandes  
 Coordenadora da CEUA/UEL

Ilmo. Sr.  
**Prof. Dr. Lucas Alécio Gomes**  
 Coordenador do Projeto  
 Departamento de Clínicas Veterinárias / Centro de Ciências Agrárias  
 Com cópia para Coordenação do Hospital Veterinário/UEL; Chefe do Departamento de Clínicas Veterinárias e  
 Diretoria do Centro de Ciências Agrárias