



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

BRUNO CESAR ELIAS

**COMPARAÇÃO DOS VALORES SÉRICOS DE ENOLASE
NEURONAL ESPECÍFICA (NSE) EM CÃES COM E SEM
ENCEFALITE**

Londrina
2016

BRUNO CESAR ELIAS

**COMPARAÇÃO DOS VALORES SÉRICOS DE ENOLASE
NEURONAL ESPECÍFICA (NSE) EM CÃES COM E SEM
ENCEFALITE**

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
2016

B222d Elias, Bruno Cesar

Gerência de redes – protocolo SNMP / Bruno Elias. – Londrina, 2016.

63f. : il.

Orientador: Lucas Alécio Gomes.

Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) □ Universidade Estadual de Londrina,

Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, 2015.

Inclui bibliografia.

1. Gerencia de redes – Teses. 2. SNMP. 3 NMS – Teses. 3. Asunto 3 – Teses. I. Gomes, Lucas Alécio. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Agrárias. III. Comparação valores séricos de enolase neuronal específica (NSE) em cães com e sem encefalite.

CDU 641:579

BRUNO CESAR ELIAS

**COMPARAÇÃO DOS VALORES SÉRICOS DE ENOLASE NEURONAL
ESPECÍFICA (NSE) EM CÃES COM E SEM ENCEFALITE**

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. Selwyn Arlington Headley
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof. Dr. Rogério Anderson Marcasso
Universidade Norte do Paraná - UNOPAR

Londrina, 26 de Fevereiro de 2016.

DEDICO

Aos meus avós, Fernando e Inês, pelo carinho e amor incondicional.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos que fizeram parte desta jornada, em especial meu orientador Prof. Dr. Lucas Alécio Gomes, por ter aceitado me orientar, e dedicar seu tempo a me proporcionar conhecimento, e incentivar a vida acadêmica, mas sobretudo pela amizade, paciência e compreensão nas horas mais difíceis.

Agradeço ao Prof. Dr. Itamar Teodorico Navarro pelo apoio e incentivo na execução deste projeto. Assim como ao Prof. João Luis Garcia e Profa. Dra. Alice Fernandes Alfieri, que além de me ajudar com as técnicas laboratoriais, disponibilizaram seus setores para o processamento das amostras.

Agradeço aos colegas que me ajudaram durante as coletas e processamento das amostras, em especial à M.V. Déborah Thaís Silva Cepelo Brunieri, M.V. Victor Bittencourt Dutra Tabacow e M.V. Msc Ana Paula da Silva que foram essenciais nas confusas práticas laboratoriais.

Agradeço aos meus amigos por me apoiarem e tornar esses anos mais alegres.

Agradeço ainda as pessoas as pessoas que contribuíram para que este sonho se tornasse realidade, em especial minha família minha mãe Neusa Ruiz Garcia, meu irmão Fabio Henrique Elias e meu pai Joaquim Elias Neto.

Agradeço a minha namorada, Bruna Gabriela Eches Perugini, que mais que tornar meus dias melhores, me deu outro significado a vida, abrindo meus olhos a necessidade de ser vivo enquanto se está vivo.

**“O homem é do tamanho do seu sonho.”
Fernando Pessoa**

ELIAS, Bruno Cesar. **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, Londrina, 2016.

RESUMO

Biomarcadores são utilizados na medicina humana e veterinária com intuito de auxiliar as condutas clínicas. A enolase neuronal específica (neuronal specific enolase - NSE) é um biomarcador de citólise neuronal, que possui estabilidade em fluídos extracelulares, como sangue e líquido cerebrospinal. Em pesquisas clínicas com humanos, foi observada confiabilidade em amostras séricas para diferenciar e estimar danos no sistema nervoso central em casos de encefalite. Na medicina veterinária, não foram encontrados estudos avaliando a expressão da NSE em amostras séricas de cães com encefalite. Deste modo, os objetivos desse estudo foram comparar os valores da NSE sérica em cães com e sem encefalite e avaliar a eficácia do teste de ELISA na detecção do biomarcador. Para isso, foram utilizados no total 38 cães, distribuídos em dois grupos, sendo 19 cães com encefalite (GE) e 19 cães sem encefalite (GS). Os critérios para inclusão para o GS foram: idade entre 1 e 7 anos, com exames clínico e laboratoriais normais. Para o GE os critérios de inclusão foram: cães com sinais neurológicos encefálicos, diagnóstico molecular positivo para cinomose, e ausência de sinais de hemólise. Quanto aos resultados obtidos verificou-se que para o GE os valores séricos de NSE mais elevados, com maior variação, e média e mediana superiores ao GS, havendo diferença significativa entre os grupos ($p = 0,0053$). A NSE pode ser mensurada nas amostras séricas testadas, demonstrando a viabilidade do teste de ELISA utilizando anticorpos humanos. Conclusão: foram detectados valores elevados de NSE em cães com encefalite quando comparados com os cães sem encefalite, e que o teste de ELISA pode ser usado para mensurar a NSE em amostras de soro de cães, e, contribuindo para a validação de NSE sérica como um biomarcador para auxiliar na avaliação de cães com encefalite.

Palavras-chave: Cão. Cérebro. Biomarcador. NSE. Cinomose.

ELIAS, Bruno Cesar. **Comparison of serum values of neuron-specific enolase (NSE) in dogs with and without encephalitis.** 2016. 63p. Dissertation (Master`s Animal Science) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2016.

ABSTRACT

The use of biomarkers in human and veterinary medicine is important to help the clinical management. Regarding to this, the specific neuronal enolase (NSE) is a biomarker resultant of the neuronal cell lysis, which demonstrate stability in extracellular fluids such as blood and cerebrospinal fluid. In human clinical researchs, was observed reliability in serum samples to distinguish and estimate the central nervous system damage in cases of encephalitis. In veterinary medicine, there are no studies evaluating the expression of NSE in serum samples from dogs with encephalitis. Thus, the objectives of this study was to compare the values of serum NSE in healty dogs and dogs with encephalitis and to evaluate the efficacy of the ELISA test using human antibodies in the detection of biomarker. For this, we used 38 dogs in total, divided into two groups, 19 dogs with encephalitis (GE) and 19 dogs without encephalitis (GS). The criteria for inclusion in to the GS were aged 1 to 7 years, with normal clinical and laboratory tests. For the GE inclusion, criteria were dogs with neurological signs brain injury, positive molecular diagnosis for distemper, and no signs of hemolysis. Regarding the results obtained it was found that for the GE serum NSE values higher with greater variation, and higher mean and median GS, there was a significant difference between the groups ($p = 0.0053$). In the serum samples tested, the NSE was effectivelly measured, demonstrating the feasibility of ELISA –using human antibodies. Conclusions: in dogs with encephalitis the NSE values werer higher when compared to dogs without encephalitis, presenting a significant difference between the groups and contributing to the validation of serum NSE as a biomarker; the ELISA test can be used to measure the NSE in serum samples of dogs.

Keywords: Dog. Brain. Biomarker. NSE. Distemper.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1 – Gráfico em forma de caixas, apresentando os valores de NSE sérica no grupo sem 2 encefalite (GS) e grupo com encefalite (GE) com três outliers neste grupo representados por \circ 43
- Figura 2 – Gráfico de dispersão dos valores de NSE do grupo sem encefalite (GS) e do grupo com 8 encefalite (GE)..... 43

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1 – Resumo da análise estatística das 19 amostras de soro dos cães do GS e do GE com média, desvio padrão e mediana dos valores de NSE e diferença entre os grupos utilizando o teste de *Kruskal-Wallis*, processadas em julho de 2015 na Universidade Estadual de Londrina 44
- Tabela 2 – Tabela apresentando a resenha, diagnóstico neuroanatômico, análise de LCE e valores de 1 NSE dos 19 cães do grupo com encefalite (GE), obtidos no período de julho de 2014 a julho de 2015, 2 na Universidade Estadual de Londrina 45

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

SNC	Sistema nervoso central
LCE	Líquido cerebroespinal
NSE	<i>Neuronal specific enolase</i> – enolase neuronal específica
GFAP	Proteína fibrilar ácida glial
MBP	Proteína básica da mielina
C-tau	Proteína tau clivada
NF-H	Neurofilamento fosforilado de cadeia pesada
MMP	Metaloproteinase de matrix
BHE	Barrera Hematoencefálica
AVC	Acidente vascular cerebral
RCP	Ressucitação cardiopulmonar
MUE	Meningoencefalite de origem desconhecida
CDV	<i>Canine distemper virus</i> – vírus da cinomose canina
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i> – reação em cadeia da polimerase
RT-PCR	<i>Reverse transcription polymerase chain reaction</i> – transcriptase reversa e reação em cadeia da polimerase
LD	Leucoencefalite desmielinizante
ES	Esclerose múltipla
TCE	Trauma crânio encefálico

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
2	REVISÃO DE LITERATURA	14
2.1	BIOMARCADORES.....	14
2.2	CLASSIFICAÇÃO DOS BIOMARCADORES	14
2.3	VARIABILIDADE DOS BIOMARCADORES	14
2.4	VALIDAÇÃO DOS BIOMARCADORES	15
2.5	CONSIDERAÇÕES PRÁTICAS	15
2.5.1	Características de Biomarcadores do SNC	16
2.5.2	Biomarcadores Proteicos Séricos em Desordens Neurológicas.....	16
2.5.3	Biomarcador Enolase Neuronal Específica (NSE)	17
2.6	ENOLASE NEURONAL ESPECÍFICA (NSE)	17
2.7	APLICAÇÕES CLÍNICAS DA NSE.....	19
2.8	VÍRUS DA CINOMOSE CANINA (CDV)	20
2.8.1	Etiologia.....	21
2.8.2	Epidemiologia.....	21
2.8.3	Patogenia e Sinais Clínicos.....	21
2.8.4	Encefalite por CDV.....	22
3	HIPÓTESE	23
4	OBJETIVOS	24
4.1	OBJETIVO GERAL.....	24
4.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	24
	REFERÊNCIAS	25
5	ARTIGO NAS NORMAS DO PERIÓDICO INTITULADO BRAIN RESEARCH COMPARISON OF SERUM VALUES OF NEURON-ESPECIFIC ENOLASE (NSE) IN DOGS WITH AND WITHOUT ENCEPHALITIS	33

6	CONCLUSÃO	46
	ANEXOS	47
	ANEXOS A - COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS	47
Tabela –	Resenhas e exames complementares de 19 cães do grupo sem encefalite (GS), 1 obtidos no período de julho de 2014 à julho de 2015, na Universidade Estadual de Londrina.).....	48
Figura -	reação de PCR que amplifica um fragmento de 287 pb do gene N de CDV. Canaleta 1: padrão 123 pb (invitrogen™ Life Technologies®, USA). Canaletas 2-12: amostras de urina. Canaletas 13-20: amostras de sangue total. C-: controle negativo utilizando água ultrapura tratada com dietil 4 pirocarbonato (DEPC) (Invitrogen™ Life Technologies®, USA).....	49
	RESUMO EXPANDIDO APRESENTADO NO 42º CONGRESSO BRAS. DE MEDICINA VETERINÁRIA E 1º CONGRESSO SUL-BRASILEIRO DA ANCLIVEPA - 31/10 A 02/11 DE 2015 - CURITIBA – PR	50
	NEURON SPECIFIC ENOLASE 43-NSEHU-E01 (ALPCO®)	54

1 1 INTRODUÇÃO

2
3 As lesões no sistema nervoso central (SNC) frequentemente causam sinais
4 clínicos multifocais e são ocasionadas, em grande parte, por doenças de origem
5 inflamatória/infeciosa, traumáticas ou vasculares, com caráter agudo ou crônico, progressivo
6 ou não. Patogênias no encéfalo podem alterar a consciência e o comportamento dos animais.
7 Em virtude disso, frequentemente se faz necessário o uso de sedativos, dificultando a
8 avaliação neurológica pareada e conseqüentemente, a interpretação da evolução do caso (Platt
9 and Garosi, 2012).

10 Há vários exames para a avaliação do SNC, como as técnicas diagnóstico
11 por imagem, análise de líquido cerebrospinal (LCE), perfil hematológico completo e
12 exames bioquímicos. Os exames de imagem como ressonância magnética e tomografia
13 computadorizada, bem como a análise de LCE são requisitados frequentemente, porém, eles
14 apresentam fatores limitantes ou de risco. As limitações relacionadas as técnicas de imagem
15 englobam custos elevados, disponibilidade regional e a necessidade de transporte dos animais
16 para grandes centros. Por outro lado, a análise de LCE é de baixo custo, entretanto, com
17 potencial para algumas situações de risco elevado, podendo levar o paciente a óbito como nos
18 casos de aumento da pressão intracraniana, mal-uso da técnica por inexperiência e
19 necessidade de anestesia geral (Nishida, 2014).

20 O uso de biomarcadores na avaliação do SNC, os quais possam ser obtidos
21 sem ocasionar riscos aos pacientes, como por exemplo, coleta de sangue, são ferramentas
22 promissoras no monitoramento de patogênias, bem como no diagnóstico, prognóstico e
23 condutas terapêuticas de cães com lesões no SNC (Nishida, 2014). Atualmente, os principais
24 biomarcadores proteicos estudados na medicina humana e que possuem estas características
25 são enolase neuronal específica (NSE) (Nakamura et al., 2012), proteína fibrilar ácida glial
26 (GFAP)(Miyake et al., 2013), proteína básica da mielina (MBP) (Levine et al., 2010);
27 proteína tau clivada (c-tau)(Roerig et al., 2013), neurofilamentos fosforilados de cadeia
28 pesada (NF-H) (Nishida et al., 2014) e metaloproteinase de matrix (MMP) (Mariani et al.,
29 2013). Considerando que a utilidade dos biomarcadores está relacionada às características
30 específicas de cada um, são realizados estudos que determinem a especificidade e
31 sensibilidade para doenças, e identifiquem a relação com processos patológicos e fisiológicos
32 no SNC, os quais podem variar de acordo com a localização e o tipo de lesão (Nishida, 2014).

33 A enolase neuronal específica (NSE – neuronal specific enolase) está entre
34 um dos principais biomarcadores de lesão de neurônios estudados na medicina humana. Ela

1 pode ser encontrada no soro e no LCE e, atualmente, foi utilizado como fator de predição e
2 prognóstico em diversos trabalhos (Chabok et al., 2012; Fendler et al., 2015; Xue et al., 2015;
3 Yokobori et al., 2013). Porém, a quantificação sérica depende da instabilidade da barreira
4 hematoencefálica (BHE), é específica para citólise de neurônios, e se mostrou relevante
5 apenas em casos agudos (Lima et al., 2004).

6 Assim sendo, o objetivo geral do presente trabalho é comparar os valores
7 séricos de NSE em cães com e sem encefalite pelo vírus da cinomose.

8

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 BIOMARCADORES

Biomarcadores são características que podem ser mensuradas de forma objetiva e que representam, direta ou indiretamente, alterações que podem ser fisiológicas ou patológicas. Assim, qualquer alteração bioquímica, celular ou molecular que evidencie essas características pode ser considerada um biomarcador (Kewal, 2010).

Os biomarcadores podem ser classificados em categorias, de acordo com as características das informações obtidas, como por exemplo: específicas a uma doença; que identificam os efeitos de drogas ou que servem como preditores de desfechos clínicos. Quando enfermidades específicas são pesquisadas, é possível reconhecer a cronologia dos eventos desde a exposição até o desenvolvimento da doença, podendo, inclusive, reconhecer fatores de risco. Mas, quando se trata de biomarcadores próprios do SNC não é possível a identificação de doenças específicas, mas sim de lesões com características de especificidade ao tecido celular lesado, e desta forma, é possível inferir os estágios de processos patológicos e avaliar a severidade, bem como a progressão, desfecho clínico e regressão da doença (Kewal, 2010).

2.2 CLASSIFICAÇÃO DOS BIOMARCADORES

A classificação dos biomarcadores segundo Kewal (2010) é a seguinte: de doença (tipo 0), de diagnóstico, para o desenvolvimento de fármacos, preditivos, para detectar os efeitos de drogas (tipo 1), de interpretação, para triagem e entre outros. Assim, os biomarcadores de doenças mais comumente utilizados nas pesquisas clínicas envolvendo enfermidades do SNC podem ser utilizados para o rastreamento de mecanismos patológicos, detecção precoce da doença, monitoramento de doenças crônicas e prognóstico (Kewal, 2010).

2.3 VARIABILIDADE DOS BIOMARCADORES

Entre as variabilidades que podem interferir nos resultados obtidos com a utilização de biomarcadores, estão presentes as características individuais dos animais a exemplo da resposta imune e metabolismo. Além disso, outros fatores também podem

1 ocasionar variações, como por exemplo erros laboratoriais. Apesar disso, biomarcadores são
2 capazes de distinguir grupos, por meio de avaliações de especificidade e sensibilidade. Ainda,
3 a consideração de fatores que possam gerar variação no delineamento de estudos diminui os
4 riscos de classificação errônea (Mayeux, 2004).

5 Desta forma, alguns estudos podem gerar explicações para variabilidade de
6 grupos e indivíduos, tais como a exposição a determinados compostos, a utilização de
7 medicamentos e dieta. Estes fatores devem ser levados em consideração para se definir as
8 causas de variabilidade (Mayeux, 2004).

10 2.4 VALIDAÇÃO DOS BIOMARCADORES

11
12 O processo de validade de um biomarcador exige avaliação estatística para
13 confirmar a confiabilidade, validade, sensibilidade e especificidade, além da exclusão de viés
14 no delineamento de pesquisa e interpretação cuidadosa dos dados, erros laboratoriais e
15 problemas com logística podem ocorrer e comprometer a pesquisa (Mayeux, 2004).

16 Para validar os biomarcadores foram sugeridos três aspectos de medição. O
17 primeiro consiste na identificação de graus que reflitam os fenômenos biológicos estudados.
18 O segundo está associado à outra característica importante das doenças, como manifestações
19 clínicas ou até mesmo outro biomarcador. E, por fim, o terceiro trata dos critérios de
20 validação, que mostram a extensão de correlações a doenças específicas, comumente
21 mensurado pela sensibilidade, especificidade e poder de predição (Mayeux, 2004; Pepe and
22 Thompson, 2000). Para que menos erros de classificação de doenças existam, é necessário
23 que se reconheça os falsos positivos e os falsos negativos, bem como a consistência da
24 probabilidade dos resultados (Naeger et al., 2013; Thompson and Zucchini, 1989).

25 Os resultados obtidos por meio do uso de biomarcadores podem conter erros
26 de interpretação quando associados aos objetivos de informações, como, ao diagnóstico,
27 prognóstico e desfecho clínico. Por exemplo, a associação de apenas um biomarcador do SNC
28 a uma doença específica pode não ser confiável, porém, pode ser o suficiente para indicar o
29 desfecho clínico do paciente (Mayeux, 2004).

31 2.5 CONSIDERAÇÕES PRÁTICAS

32
33 O uso de biomarcadores em estudos clínicos possui as vantagens de ser
34 objetivo, preciso, com menor fomento de questionários, estudar os mecanismos de doença, e

1 possuir a capacidade de homogenizar os riscos ou doenças e poder ser validado. Porém, há
2 necessidade de planejamento para evitar que fatores de interferência, como padronização de
3 técnicas laboratoriais, logística de coleta e armazenamento de amostras, e fatores
4 interindividuais como materiais utilizados e características de população como idade, dieta, e
5 gênero possam influenciar nos resultados de pesquisa. Além disso a escolha de amostras
6 biológicas a ser utilizada pode ser um fator limitante, quando o procedimento de coleta
7 acrescenta risco ao paciente, como por exemplo o uso de LCE que necessita de anestesia geral
8 e destreza do clínico para a coleta, por isso o uso amostras que não ofereçam riscos ao
9 paciente, como sangue e urina possuem uma aceitação melhor para pesquisa, mas além disso
10 é necessário atender às responsabilidades éticas (Mayeux, 2004).

11 12 2.5.1 Características de Biomarcadores do SNC

13
14 A avaliação do SNC possui desafios quanto a compreensão dos mecanismos
15 patológicos, diagnóstico e tratamento de afecções neurológicas. Os biomarcadores são
16 utilizados para auxiliar o entendimento dessas enfermidades, porém, possuem limitações
17 como: acesso aos tecidos acometidos, limitação da disponibilidade de biomarcadores em
18 amostras biológicas extracraniana, dificuldade em diagnosticar doenças e dimensionar a
19 extensão da lesão, dificuldade em especificar o tecido cerebral acometido e a escassez de
20 modelos de validação (Kewal, 2010).

21 As características desejáveis de biomarcador ideal para injúrias do SNC são
22 de que possuam especificidade e sensibilidade a uma doença ou estado patológico, que esteja
23 correlacionado com a progressão da lesão ou doença, que utilizem amostras de fácil coleta
24 como o sangue e que os resultados obtidos possam ser replicados na prática clínica,
25 auxiliando a determinar o prognóstico e eficácia terapêutica (Kewal, 2010; Nishida, 2014).

26 27 2.5.2 Biomarcadores Proteicos Séricos em Desordens Neurológicas

28
29 Os biomarcadores de proteína encontrados no sangue, são mensurados
30 mediante testes com anticorpos específicos à proteína, a exemplo do teste de ELISA. Dentre
31 as principais proteínas pesquisadas, como biomarcadores, na medicina humana e veterinária
32 estão a NSE, GFAP, MBP, c-tau, NF-H, MMP e S-100 (Kewal, 2010; Nishida, 2014).

2.5.3 Biomarcador Enolase Neuronal Específica (NSE)

O biomarcador NSE é encontrado em amostras de sangue e LCE, e pode ser mensurado mediante a testes com anticorpos específicos à proteína, a exemplo do teste de ELISA, e possui como característica a especificidade de neurônios e células neuroendócrinas (Marangos and Schmechel, 1987). Em estudos com seres humanos observou-se uma relação positiva entre os valores de NSE e danos no SNC em pacientes neurológicos (Hajduková et al., 2015; Rech et al., 2006a). Outros estudos foram realizados para comprarar a associação da NSE em cães com afecções neurológicas, utilizando apenas o LCE (Nakamura et al., 2012; Satoh et al., 2007).

2.6 ENOLASE NEURONAL ESPECÍFICA (NSE)

A NSE, também chamada anteriormente de 2-fosfo-D glicerato hidrolase e hidratase fosfopiruvato, é uma enzima glicolítica intracitoplasmática de forma dimerica composta por cinco formas de isoenzimas: alfa-alfa ($\alpha\alpha$); alfa-gama ($\alpha\gamma$); gama-gama ($\gamma\gamma$); alfa-beta ($\alpha\beta$) e beta-beta ($\beta\beta$) (Marangos et al., 1978). Entretanto, apenas isoenzimas que possuem a subunidade gama (γ) são encontradas nos neurônios e nas células neuroendócrinas, na forma de isoenzimas $\alpha\gamma$ e $\gamma\gamma$ com 82,5 e 78-kD, respectivamente (Fletcher et al., 1976; Marangos and Schmechel, 1987). Por conta da especificidade aos neurônios e sua atividade enzimática, responsável pela conversão do 2-fosfo-D glicerato em fosfoenolpiruvato, as formas de isoenzimas $\alpha\gamma$ e $\gamma\gamma$ foram intituladas como NSE. (Fletcher et al., 1976). Essa enzima possui função glicolítica e de transporte axonal lento, com maior quantidade em substância cinzenta, com prevalência no cerebelo, hipocampo, córtex, tálamo e núcleos subcorticais. A NSE, ainda, pode representar 0,4 a 2,2% do total de proteínas solúveis em determinadas regiões do encéfalo, chegando a constituir de 3 a 4 % do total de proteínas solúveis em alguns neurônios (Marangos and Schmechel, 1987).

A NSE, além de ser expressada seletivamente em neurônios, possui grande estabilidade em outros fluidos biológicos, por ser uma proteína citoplasmática solúvel livre, que pode facilmente passar para o meio extracelular quando há injúria da membrana neuronal, e que por consequência pode ser encontrada no LCE e no sangue, em casos de lesão neuronal (Marangos and Schmechel, 1987).

Conforme estudo na medicina humana que comparou a expressão do biomarcador em amostras sérica com a de LCE, foi observado que ambas as amostras são

1 suficientes para identificar as lesões em neurônios, porém, a permeabilidade da barreira
2 hematoencefálica (BHE) é um fator limitante para biodisponibilidade no sangue (Marangos
3 and Schmechel, 1987).

4 Por sua vez, em um estudo no qual se mensurou a NSE em amostras séricas
5 e de LCE de humanos com diferentes afecções neurológicas, observou valores significativos
6 em ambas amostras de pacientes com encefalites, contudo, em outras doenças como *status*
7 *epilepticus* não convulsivo e *vasculiti* cerebral, não foram observados valores similares entre
8 as amostras, sendo que a principal justificativa para os casos de encefalite é de que há
9 aumento da permeabilidade da BHE em casos inflamatórios (Lima et al., 2004). Além de que,
10 lesões em substância cinzenta resultam em valores maiores de NSE, devido à concentração
11 de neurônios (Marangos and Schmechel, 1987).

12 Ainda, em trabalhos avaliando a expressão das isoenzimas em fetos
13 humanos, foi constatado que a forma $\alpha\alpha$ é predominante quando comparado ao tecido
14 encefálico adulto (Fletcher et al., 1976; Kato et al., 1984; Marangos et al., 1980; Yoshida et
15 al., 1983). Essa informação reforça a ideia de que a NSE é expressa em células neuronais após
16 a completa diferenciação e desenvolvimento funcional (Marangos et al., 1980; Marangos and
17 Schmechel, 1987).

18 Em uma pesquisa avaliando a formação do sistema vestibular e de audição
19 de galinhas, foi observado que a expressão de NSE só ocorreu após o início da função de
20 atividade sináptica (Maxwell et al., 1982). Desta forma, fica evidente que a expressão da
21 NSE ocorre após a formação funcional da célula neuronal (Marangos et al., 1980). Além
22 disso, é sugerido que haja uma estreita relação entre a atividade de função sináptica com a
23 expressão de NSE, em diferentes classes de neurônios adultos que possam estar relacionadas
24 com a regulação específica dos níveis de NSE, e, conseqüentemente, com as necessidades
25 metabólicas (Marangos and Schmechel, 1987).

26 A NSE também é encontrada nas hemácias e plaquetas, entretanto, menos
27 de 1% da NSE encontrada em plaquetas possui a estrutura de isoenzima $\gamma\gamma$ (Marangos and
28 Schmechel, 1987). Apesar disso, constatou-se por meio de estudos que as plaquetas e
29 eritrócitos podem representar significativas alterações na mensuração da NSE em casos de
30 hemólise (Day and Thompson, 1984). Portanto, em trabalhos com intuito de mensurar a
31 concentração sérica da NSE, se faz necessário mencionar a possibilidade de hemólise, a fim
32 de evitar resultados falso positivo (Johnsson et al., 2000; Planche et al., 2010).

2.7 APLICAÇÕES CLÍNICAS DA NSE

As aplicações clínicas da NSE são enfatizadas pela característica de ser encontrada em células neuronais e neuroendócrinas, desta forma, a presença da NSE em valores acima do normal no soro e no LCE, sugere alterações metabólicas como a morte de neurônios (Marangos and Schmechel, 1987). Alguns estudos vinculados ao uso de NSE envolvendo as doença de Alzheimer, de Huntington e Esclerose Lateral Amiotrófica foram propostos, entretanto, há dificuldade na interpretação dos resultados em relação às enfermidades propostas pelo fato de que as lesões em neurônios provocando a liberação da NSE podem ocorrer de forma silenciosa, ou seja, antes que os sintomas neurológicos se manifestem (Marangos and Schmechel, 1987).

Em alguns estudos a NSE foi mensurada no soro e LCE de pacientes humanos com trauma crânioencefálico (TCE) (Yokobori et al., 2013), com acidente vascular cerebral (AVC) (Schaarschmidt et al., 1994), que passaram por ressuscitação cardiopulmonar (RCP) (Pfeifer et al., 2005; Rech et al., 2006a; Rosén et al., 2001; Schoerhuber et al., 1999), ou que foram submetidos a cirurgias cardíacas (Johnsson et al., 2000), e demonstrou-se aumento significativo da referida enzima. O mesmo foi observado no caso de cães submetidos à parada circulatória por meio de estudo experimental (Usui et al., 1994). O uso clínico da NSE em casos de TCE demonstrou que ela expressa maior especificidade quando se trata de lesão em neurônios (biodisponibilidade no soro e no LCE), ainda que possa ser encontrada em hemácias e plaquetas, pois seu níveis podem sofrer interferência extracraniana em casos de hemólise (Yokobori et al., 2013).

Segundo pesquisa realizada com seres humanos portadores de afecções neurológicas distintas, a NSE produz estimativa confiável da lesão cerebral, entretanto, é inconsistente em lesões cerebrais discretas ou de caráter crônico. Também foi observado que em casos de encefalites (neurotoxoplasmose, encefalite herpética e cerebrite por lúpus), convulsões, doença vascular entre outras houve aumento da NSE, predominantemente em relação às encefalites, reforçando a importância desta enzima como marcador adjuvante na detecção de lesões encefálicas inflamatórias (Lima et al., 2004).

Em um estudo no qual compararam a análise de amostras de LCE de cães saudáveis e com meningoencefalite de etiologia desconhecida (MUE), utilizando eletroforese, foi observado aumento significativo da NSE nos cães com encefalites. Contudo, a NSE não foi associada a um biomarcador de diagnóstico, pois qualquer doença que cause a morte de

1 neurônios pode aumentar a liberação de NSE. Ainda assim, foi suficiente para diferenciar os
2 cães com encefalite (Nakamura et al., 2012).

3 Em um estudo, cães foram submetidos a parada circulatória para se estimar o
4 dano cerebral mediante o uso de biomarcadores. Observou-se que os valores de NSE no LCE
5 e no soro se elevaram uma hora e duas horas após o restabelecimento da circulação,
6 respectivamente (Usui et al., 1994).

7 Em pacientes humanos que sofreram RCP a NSE foi utilizada como fator de
8 prognóstico, uma vez que possui alta sensibilidade e especificidade relacionada à lesão neuronal
9 (Rech et al., 2006a), a exemplo de estudos nos quais se observaram a associação de valores
10 elevados da NSE sérica com mau prognóstico nos casos de coma após a RCP (Pfeifer et al.,
11 2005; Rech et al., 2006a; Rech et al., 2006b; Rosén et al., 2001). Atualmente, há estudos
12 avaliando a relação de NSE em humanos submetidos à cirurgia cardíaca, e que
13 desenvolveram disfunções cognitivas no pós-operatório (Cata et al., 2011).

14 A NSE também foi pesquisada como “ferramenta” auxiliar no diagnóstico e
15 prognóstico de neoplasias neuroendócrinas e no encefalo, como glioblastomas (Fendler et al.,
16 2015; Yan et al., 2011) e tumores neuroblástico (Fendler et al., 2015), além de mieloma
17 múltiplo (Yang et al., 2014) e carcinoma de células pequenas em pulmão (Inomata et al.,
18 2015; Xue et al., 2015).

19 20 2.8 VÍRUS DA CINOMOSE CANINA (CDV)

21
22 A cinomose é uma doença infecciosa, contagiosa, de ocorrência mundial,
23 causada por um morbillivírus da família paramyxoviridae (MACLACHLAN and DUBOVI,
24 2011). O hospedeiro natural são os animais da família e ordem carnívora, em especial das
25 famílias Canidae, Procyonidae, Mustelidae, Mephitidae, Hyaenidae, Ailuridae, Viverridae e
26 Felidae (Osterhaus et al., 1995; Summers and Appel, 1994). Os primeiros relatos descritos de
27 cinomose sugerem que tenha ocorrido na europa, entretanto, uma doença contagiosa em cães
28 com características similares a cinomose foi descrita em 1700 no Peru (Howell, 1965). As
29 teorias iniciais eram de que a causa da doença fosse uma bactéria, sendo que o
30 reconhecimento da teoria de que se tratava de um vírus somente foi aceita 1926 após a
31 divulgação de um experimento com ferrets, a qual identificou seis cepas virais (Howell,
32 1965).

1 2.8.1 Etiologia

2
3 O vírus da cinomose é estruturado por seis proteínas, e possui envelope
4 lípidico com duas glicoproteínas de superfícies que são responsáveis pela invasão nas células
5 (Hall et al, 1980). Apesar de haver semelhança entre os vírus da mesma família, o vírus da
6 cinomose possui pouca variedade de hospedeiros, entre os vírus que compartilham estas
7 características gênicas e antigênicas, está incluso o vírus do sarampo que acomete a espécie
8 humana, vírus da peste bovina, e o da peste dos pequenos ruminantes (ovelhas e cabras)
9 (MACLACHLAN and DUBOVI, 2011).

10 11 2.8.2 Epidemiologia

12
13 A prevalência de cães infectados pelo vírus da cinomose no Brasil é alta
14 (Figuera et al., 2008; HEADLEY and GRAÇA, 2000; Sonne et al., 2009), e possui fatores
15 associados como a infecção de animais susceptíveis em áreas urbanas, maior número de cães
16 semi-domiciliados, presença de variação nas cepas do vírus (Castilho et al., 2007), maior
17 frequência no período do inverno e ainda trabalhos sugerem predisposição a cães dolicefálicos
18 quando comparados aos braquicefálicos (HEADLEY and GRAÇA, 2000).

19 Cães de todas as faixas etária podem adquirir a doença, entretanto, animais
20 jovens com idade entre três e seis meses são mais acometidos, pois a produção de resposta
21 humoral com títulos suficientes de soroneutralizadores para CDV, pode levar até seis meses
22 após a primeira vacina (Hartmann et al., 2007).

23 A vacinação é a melhor forma de controle e prevenção da cinomose em
24 cães, entretanto, animais vacinados podem adquirir a doença (Ek-Kommonen et al., 1997),
25 pois as cepas utilizadas para indução de imunização não são eficazes para todas (Negrão et
26 al., 2006). Ainda há a possibilidade de falhas na vacinação incluindo erros de aplicação,
27 refrigeração e ineficácia da vacina, imunossupressão e anulação da vacina por anticorpos
28 maternos (Silva et al., 2009) .

29 30 2.8.3 Patogenia e Sinais Clínicos

31
32 A infecção de cães acontece por aerossóis. O período de incubação dura em
33 média sete dias, com apresentações clínicas variáveis. O vírus da cinomose é pantrópico,
34 porém, com evidente epiteliotropismo e replicação oronasal primária na maioria dos casos,

1 com consequente sinais clínicos de dermatite pustular e broncopneumonia bacteriana
2 secundária. A imunossupressão causada pelo vírus, mais acentuada em células T e a resposta
3 humoral está relacionada ao desfecho clínico, bem como a prevalência de infecções
4 secundárias e oportunistas como toxoplasmose e neosporose (Greene and Vandeveld, 2012).
5 Após lesionar o SNC a principal causa de seqüela em cães é a leucoencefalite desmielinizante
6 (LD), com a possibilidade de reações tardias semelhante a pan-encefalite subaguda
7 esclerosante comumente denominada como encefalite do cão velho (Headley et al., 2009;
8 Nessler et al., 1999; Summers and Appel, 1994).

9 O vírus da cinomose, por demonstrar características de desmielinização é
10 considerado por alguns pesquisadores como um modelo relevante para comparação com
11 doenças desmielinizantes em seres humanos a exemplo da esclerose múltipla (Alldinger et al.,
12 2006).

13 14 2.8.4 Encefalite por CDV

15
16 Cães acometidos com o vírus da cinomose podem apresentar sinais
17 neurológicos variados de acordo com os locais da lesão, como alteração de consciência,
18 comportamento, dos nervos cranianos, além de lesões em neurônios motores superiores
19 ocasionando paraparesia ou até paralisia (Greene and Vandeveld, 2012).

20 Outros sinais clínicos sistêmicos como apatia, anorexia, febre, tosse,
21 vômito, diarreia, hiperqueratose, pústulas abdominais, corrimentos nasais e oculares podem
22 ser observados (Amude et al., 2006).

23 As manifestações clínico-patológicas da cinomose no SNC podem ser
24 variáveis e são descritas como: encefalopatia dos cães jovens; encefalopatia dos cães adultos;
25 encefalopatia dos cães velhos; encefalopatia pós-vacinal; polioencefalite com corpúsculos de
26 inclusão da cinomose (Nessler et al., 1999). É observado lesões desmielinizantes com
27 astrócitos reativos em cérebros de cães acometidos pelo vírus, (Sonne et al., 2009).

1 **3 HIPÓTESE**

2

3

4

5

6

7

8

A NSE é uma enzima que pode ser detectada no soro como um biomarcador. Assim sendo, aventa-se a hipótese de que ela pode ser mensurada no soro de cães por meio de teste de ELISA destinado para o uso em seres humanos. Outra hipótese é que cães com encefalite apresentarão valores séricos elevados de NSE quando comparado com cães sem encefalite.

1 **4 OBJETIVOS**

2

3 4.1 OBJETIVO GERAL

4

5 Comparar os valores de enolase neuronal específica em cães com e sem
6 encefalite pelo vírus da cinomose.

7

8 4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

9

10 1. Avaliar a eficácia do teste de ELISA destinado a seres humanos para a
11 detecção de NSE sérica em cães.

12 2. Determinar e comparar os valores de NSE sérica em cães com e sem
13 encefalite pelo vírus da cinomose;

14

15

16

1 REFERÊNCIAS

2
3 ABREU, C. B. D. et al. Toxoplasmose ocular em cães jovens inoculados com
4 *Toxoplasma gondii*. **Ciência Rural**, v. 32, p. 807-812, 2002. ISSN 0103-8478.
5 Disponível em: < [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-84782002000500011&nrm=iso)
6 [84782002000500011&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-84782002000500011&nrm=iso) >.

7
8 ALLDINGER, S. et al. Roles of an extracellular matrix (ECM) receptor and ECM
9 processing enzymes in demyelinating canine distemper encephalitis. **Dtsch Tierarztl**
10 **Wochenschr**, v. 113, n. 4, p. 151-2, 154-6, Apr 2006. ISSN 0341-6593. Disponível
11 em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16716051> >.

12
13 AMUDE, A. M.; ALFIERI, A. A.; ALFIERI, A. F. Antemortem diagnosis of CDV
14 infection by RT-PCR in distemper dogs with neurological deficits without the typical
15 clinical presentation. **Vet Res Commun**, v. 30, n. 6, p. 679-87, Aug 2006. ISSN
16 0165-7380. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16838210> >.

17
18 BARBER, J. S.; TREES, A. J. Naturally occurring vertical transmission of *Neospora*
19 *caninum* in dogs. **Int J Parasitol**, v. 28, n. 1, p. 57-64, Jan 1998. ISSN 0020-7519.
20 Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9504335> >.

21
22 BJÖRKMAN, C.; UGGLA, A. Serological diagnosis of *Neospora caninum* infection.
23 **Int J Parasitol**, v. 29, n. 10, p. 1497-507, Oct 1999. ISSN 0020-7519. Disponível em:
24 < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10608435> >.

25
26 BOBIĆ, B. et al. Risk factors for *Toxoplasma* infection in a reproductive age female
27 population in the area of Belgrade, Yugoslavia. **Eur J Epidemiol**, v. 14, n. 6, p. 605-
28 10, Sep 1998. ISSN 0393-2990. Disponível em: <
29 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9794128> >.

30
31 CASTILHO, J. G. et al. Molecular analysis of the N gene of canine distemper virus in
32 dogs in Brazil. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 59, p.
33 654-659, 2007. ISSN 0102-0935. Disponível em: <
34 [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-09352007000300016&nrm=iso)
35 [09352007000300016&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-09352007000300016&nrm=iso) >.

36
37 CATA, J. P.; ABDELMALAK, B.; FARAG, E. Neurological biomarkers in the
38 perioperative period. **Br J Anaesth**, v. 107, n. 6, p. 844-58, Dec 2011. ISSN 1471-
39 6771. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22065690> >.

40
41 CHABOK, S. Y. et al. Neuron-specific enolase and S100BB as outcome predictors in
42 severe diffuse axonal injury. **J Trauma Acute Care Surg**, v. 72, n. 6, p. 1654-7, Jun
43 2012. ISSN 2163-0763. Disponível em: <
44 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22695436> >.

45
46 DAVIDSON, M. G. Toxoplasmosis. **Vet Clin North Am Small Anim Pract**, v. 30, n.
47 5, p. 1051-62, Sep 2000. ISSN 0195-5616. Disponível em: <
48 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11033874> >.

49

- 1 DAY, I. N.; THOMPSON, R. J. Levels of immunoreactive aldolase C, creatine kinase-
2 BB, neuronal and non-neuronal enolase, and 14-3-3 protein in circulating human
3 blood cells. **Clin Chim Acta**, v. 136, n. 2-3, p. 219-28, Jan 1984. ISSN 0009-8981.
4 Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6692576> >.
5
- 6 DE SOUZA, S. L. et al. Prevalence of Neospora caninum antibodies in dogs from
7 dairy cattle farms in Parana, Brazil. **J Parasitol**, v. 88, n. 2, p. 408-9, Apr 2002. ISSN
8 0022-3395. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12054023> >.
9
- 10 DENKERS, E. Y. et al. Emergence of NK1.1+ cells as effectors of IFN-gamma
11 dependent immunity to Toxoplasma gondii in MHC class I-deficient mice. **J Exp Med**,
12 v. 178, n. 5, p. 1465-72, Nov 1993. ISSN 0022-1007. Disponível em: <
13 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8228800> >.
14
- 15 DUBEY, J. P. Strategies to reduce transmission of Toxoplasma gondii to animals and
16 humans. **Vet Parasitol**, v. 64, n. 1-2, p. 65-70, Aug 1996. ISSN 0304-4017.
17 Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8893464> >.
18
- 19 DUBEY, J. P. et al. Newly recognized fatal protozoan disease of dogs. **J Am Vet**
20 **Med Assoc**, v. 192, n. 9, p. 1269-85, May 1988. ISSN 0003-1488. Disponível em: <
21 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3391851> >.
22
- 23 DUBEY, J. P.; LAPPIN, M. R. Toxoplasmosis and Neosporosis. In: GREENE, C. E.
24 (Ed.). **Infectious Diseases of the dog and cat**. St. Louis, Missouri: Elsevier, 2012.
25 cap. 79, p.806 - 827.
26
- 27 DUBEY, J. P.; LINDSAY, D. S. A review of Neospora caninum and neosporosis. **Vet**
28 **Parasitol**, v. 67, n. 1-2, p. 1-59, Dec 1996. ISSN 0304-4017. Disponível em: <
29 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9011014> >.
30
- 31 DUBEY, J. P.; SCHARES, G.; ORTEGA-MORA, L. M. Epidemiology and control of
32 neosporosis and Neospora caninum. **Clin Microbiol Rev**, v. 20, n. 2, p. 323-67, Apr
33 2007. ISSN 0893-8512. Disponível em: <
34 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17428888> >.
35
- 36 DUBEY, J. P.; SU, C. Population biology of Toxoplasma gondii: what's out and where
37 did they come from. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 104, n. 2, p. 190-5, Mar 2009. ISSN
38 1678-8060. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19430643> >.
39
- 40 EK-KOMMONEN, C. et al. Outbreak of canine distemper in vaccinated dogs in
41 Finland. **Vet Rec**, v. 141, n. 15, p. 380-3, Oct 1997. ISSN 0042-4900. Disponível em:
42 < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9364705> >.
43
- 44 FENDLER, W. P. et al. Combined Scintigraphy and Tumor Marker Analysis Predicts
45 Unfavorable Histopathology of Neuroblastic Tumors with High Accuracy. **PLoS One**,
46 v. 10, n. 7, p. e0132809, 2015. ISSN 1932-6203. Disponível em: <
47 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26177109> >.
48
- 49 FLETCHER, L.; RIDER, C. C.; TAYLOR, C. B. Enolase isoenzymes. III.
50 Chromatographic and immunological characteristics of rat brain enolase. **Biochim**

1 **Biophys Acta**, v. 452, n. 1, p. 245-52, Nov 1976. ISSN 0006-3002. Disponível em: <
2 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/990313> >.

3
4 FRENKEL, J. K. Toxoplasmosis in human beings. **J Am Vet Med Assoc**, v. 196, n.
5 2, p. 240-8, Jan 1990. ISSN 0003-1488. Disponível em: <
6 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2404922> >.

7
8 FRENKEL, J. K.; DUBEY, J. P.; MILLER, N. L. Toxoplasma gondii in cats: fecal
9 stages identified as coccidian oocysts. **Science**, v. 167, n. 3919, p. 893-6, Feb 1970.
10 ISSN 0036-8075. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4903651> >.

11
12 GARCIA, J. L. et al. Toxoplasma gondii: detection by mouse bioassay,
13 histopathology, and polymerase chain reaction in tissues from experimentally
14 infected pigs. **Exp Parasitol**, v. 113, n. 4, p. 267-71, Aug 2006. ISSN 0014-4894.
15 Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16545804> >.

16
17 _____. Soroepidemiologia da toxoplasmose em gatos e cães de propriedades
18 rurais do município de Jaguapitã, estado do Paraná, Brasil. **Ciência Rural**, v. 29, p.
19 99-104, 1999. ISSN 0103-8478. Disponível em: <
20 [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-
21 84781999000100018&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-84781999000100018&nrm=iso) >.

22
23 GENNARI, S. M. et al. Occurrence of Neospora caninum antibodies in sera from
24 dogs of the city of São Paulo, Brazil. **Vet Parasitol**, v. 106, n. 2, p. 177-9, Jun 2002.
25 ISSN 0304-4017. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12031819> >.

26
27 GREENE, C. E.; VANDEVELDE, M. Infectious Diseases of the Dog and Cat. In:
28 GREENE, C. E. (Ed.). **Infectious Diseases of the Dog and Cat**. St Louis, Missouri:
29 Elsevier Inc, v.4Th ed, 2012. cap. Canine Distemper, p.25 - 42.

30
31 GUIMARÃES, J. S. et al. Prevalence of Neospora caninum antibodies and factors
32 associated with their presence in dairy cattle of the north of Paraná state, Brazil. **Vet**
33 **Parasitol**, v. 124, n. 1-2, p. 1-8, Sep 2004. ISSN 0304-4017. Disponível em: <
34 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15350656> >.

35
36 HARTMANN, T. L. S. et al. Anticorpos neutralizantes contra os vírus da cinomose e
37 da parainfluenza em cães de canis dos municípios de Novo Hamburgo e Porto
38 Alegre, RS, Brasil. **Ciência Rural**, v. 37, p. 1178-1181, 2007. ISSN 0103-8478.
39 Disponível em: < [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-
40 84782007000400045&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-84782007000400045&nrm=iso) >.

41
42 HAY, W. H. et al. Diagnosis and treatment of Neospora caninum infection in a dog. **J**
43 **Am Vet Med Assoc**, v. 197, n. 1, p. 87-9, Jul 1990. ISSN 0003-1488. Disponível em:
44 < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2370226> >.

45
46 HEADLEY, S. A. et al. Molecular detection of Canine distemper virus and the
47 immunohistochemical characterization of the neurologic lesions in naturally occurring
48 old dog encephalitis. **J Vet Diagn Invest**, v. 21, n. 5, p. 588-97, Sep 2009. ISSN
49 1040-6387. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19737753> >.

- 1 HEADLEY, S. A.; GRAÇA, D. L. Canine distemper: epidemiological findings of 250
2 cases. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 37, p.
3 00-00, 2000. ISSN 1413-9596. Disponível em: <
4 [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1413-
5 95962000000200009&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1413-95962000000200009&nrm=iso) >.
6
- 7 HEMPHILL, A. The host-parasite relationship in neosporosis. **Adv Parasitol**, v. 43, p.
8 47-104, 1999. ISSN 0065-308X. Disponível em: <
9 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10214690> >.
10
- 11 HILL, D. E. et al. Specific detection of Neospora caninum oocysts in fecal samples
12 from experimentally-infected dogs using the polymerase chain reaction. **J Parasitol**,
13 v. 87, n. 2, p. 395-8, Apr 2001. ISSN 0022-3395. Disponível em: <
14 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11318571> >.
15
- 16 HOWELL, D. G. Immunization of the Dog. **Can Vet J**, v. 6, n. 6, p. 127-36, Jun 1965.
17 ISSN 0008-5286. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17421769> >.
18
- 19 INOMATA, M. et al. Plasma neuron-specific enolase level as a prognostic marker in
20 patients with non-small cell lung cancer receiving gefitinib. **Mol Clin Oncol**, v. 3, n. 4,
21 p. 802-806, Jul 2015. ISSN 2049-9450. Disponível em: <
22 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26171184> >.
23
- 24 JERICÓ, M. M.; NETO, J. P. D. A.; KOGIKA, M. M. Tratado de Medicina Interna de
25 Cães e Gatos. In: VIDOTTO, O.; NAVARRO, I. T., et al (Ed.). **Tratado de Medicina**
26 **Interna de Cães e Gatos**. 1 ed. Rio de Janeiro, RJ: Editora Roca, v.1, 2015. cap.
27 Toxoplasmose, p.703 - 712.
28
- 29 JOHNSON, P. et al. Neuron-specific enolase increases in plasma during and
30 immediately after extracorporeal circulation. **Ann Thorac Surg**, v. 69, n. 3, p. 750-4,
31 Mar 2000. ISSN 0003-4975. Disponível em: <
32 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10750755> >.
33
- 34 KATO, K. et al. Developmental profile of three enolase isozymes in rat brain
35 determination from one-cell embryo to adult brain. **Neurochem Int**, v. 6, n. 1, p. 51-4,
36 1984. ISSN 0197-0186. Disponível em: <
37 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20488019> >.
38
- 39 KEWAL, J. K. Introduction. In: KEWAL, J. K. (Ed.). **The Handbook of Biomarkers**.
40 New York, NY: Springer, v.1, 2010. cap. 1, p.1 - 20.
41
- 42 LEVINE, G. J. et al. Cerebrospinal fluid myelin basic protein as a prognostic
43 biomarker in dogs with thoracolumbar intervertebral disk herniation. **J Vet Intern**
44 **Med**, v. 24, n. 4, p. 890-6, 2010 Jul-Aug 2010. ISSN 0891-6640. Disponível em: <
45 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20492479> >.
46
- 47 LIMA, J. E. et al. Use of neuron-specific enolase for assessing the severity and
48 outcome in patients with neurological disorders. **Braz J Med Biol Res**, v. 37, n. 1, p.
49 19-26, Jan 2004. ISSN 0100-879X. Disponível em: <
50 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14689039> >.

- 1
2 LINDSAY, D. S.; DUBEY, J. P. Immunohistochemical diagnosis of *Neospora*
3 *caninum* in tissue sections. **Am J Vet Res**, v. 50, n. 11, p. 1981-3, Nov 1989. ISSN
4 0002-9645. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2694869> >.
5
- 6 MACLACHLAN, N. J.; DUBOVI, E. J. Paramyxoviridae. In: PRESS, A. (Ed.).
7 **Fenner's veterinary virology**. 4. California, San Diego Academic Press, 2011.
8 p.299-325.
9
- 10 MACPHERSON, J. M.; GAJADHAR, A. A. Sensitive and specific polymerase chain
11 reaction detection of *Toxoplasma gondii* for veterinary and medical diagnosis. **Can J**
12 **Vet Res**, v. 57, n. 1, p. 45-8, Jan 1993. ISSN 0830-9000. Disponível em: <
13 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8431804> >.
14
- 15 MARANGOS, P. J.; SCHMECHEL, D. E. Neuron specific enolase, a clinically useful
16 marker for neurons and neuroendocrine cells. **Annu Rev Neurosci**, v. 10, p. 269-95,
17 1987. ISSN 0147-006X. Disponível em: <
18 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3551759> >.
19
- 20 MARANGOS, P. J. et al. Developmental profile of neuron-specific (NSE) and non-
21 neuronal (NNE) enolase. **Brain Res**, v. 190, n. 1, p. 185-93, May 1980. ISSN 0006-
22 8993. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6769532> >.
23
- 24 _____. Neuronal, non-neuronal and hybrid forms of enolase in brain: structural,
25 immunological and functional comparisons. **Brain Res**, v. 150, n. 1, p. 117-33, Jul
26 1978. ISSN 0006-8993. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/78744>
27 >.
28
- 29 MARIANI, C. L. et al. Evaluation of matrix metalloproteinase-2 and -9 in the
30 cerebrospinal fluid of dogs with intracranial tumors. **Am J Vet Res**, v. 74, n. 1, p. 122-
31 9, Jan 2013. ISSN 1943-5681. Disponível em: <
32 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23270356> >.
33
- 34 MAXWELL, G. D. et al. Development of neuron-specific enolase immunoreactivity in
35 avian nervous tissue in vivo and in vitro. **Brain Res**, v. 255, n. 3, p. 401-18, Mar
36 1982. ISSN 0006-8993. Disponível em: <
37 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7066697> >.
38
- 39 MAYEUX, R. Biomarkers: potential uses and limitations. **NeuroRx**, v. 1, n. 2, p. 182-
40 8, Apr 2004. ISSN 1545-5343. Disponível em: <
41 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15717018> >.
42
- 43 MCALLISTER, M. M. et al. Dogs are definitive hosts of *Neospora caninum*. **Int J**
44 **Parasitol**, v. 28, n. 9, p. 1473-8, Sep 1998. ISSN 0020-7519. Disponível em: <
45 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9770635> >.
46
- 47 MIYAKE, H. et al. Serum glial fibrillary acidic protein as a specific marker for
48 necrotizing meningoencephalitis in Pug dogs. **J Vet Med Sci**, v. 75, n. 11, p. 1543-5,
49 Nov 2013. ISSN 1347-7439. Disponível em: <
50 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23856761> >.

- 1
2 NAEGER, D. M. et al. Correctly using sensitivity, specificity, and predictive values in
3 clinical practice: how to avoid three common pitfalls. **AJR Am J Roentgenol**, v. 200,
4 n. 6, p. W566-70, Jun 2013. ISSN 1546-3141. Disponível em: <
5 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23701086> >.
6
- 7 NAKAMURA, K. et al. Proteome analysis of cerebrospinal fluid in healthy beagles
8 and canine encephalitis. **J Vet Med Sci**, v. 74, n. 6, p. 751-6, Jun 2012. ISSN 1347-
9 7439. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22251802> >.
10
- 11 NEGRÃO, F. J. et al. Perfil de restrição de um fragmento do gene da hemaglutinina
12 amplificado pela RT-PCR a partir de estirpes vacinais e selvagens do vírus da
13 cinomose canina. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 58,
14 p. 1099-1106, 2006. ISSN 0102-0935. Disponível em: <
15 [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-
16 09352006000600019&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-09352006000600019&nrm=iso) >.
17
- 18 NESSELER, A. et al. Restricted virus protein translation in canine distemper virus
19 inclusion body polyencephalitis. **Vet Microbiol**, v. 69, n. 1-2, p. 23-8, Sep 1999.
20 ISSN 0378-1135. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10515265> >.
21
- 22 NISHIDA, H. Biomarkers for neural injury and infection in small animals. **Vet Clin
23 North Am Small Anim Pract**, v. 44, n. 6, p. 1187-99, Nov 2014. ISSN 1878-1306.
24 Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25199840> >.
25
- 26 NISHIDA, H. et al. Evaluation of serum phosphorylated neurofilament subunit NF-H
27 as a prognostic biomarker in dogs with thoracolumbar intervertebral disc herniation.
28 **Vet Surg**, v. 43, n. 3, p. 289-93, Mar 2014. ISSN 1532-950X. Disponível em: <
29 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24467275> >.
30
- 31 ORDEIX, L. et al. Cutaneous neosporosis during treatment of pemphigus foliaceus
32 in a dog. **J Am Anim Hosp Assoc**, v. 38, n. 5, p. 415-9, 2002 Sep-Oct 2002. ISSN
33 0587-2871. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12220024> >.
34
- 35 OSTERHAUS, A. D. et al. Morbillivirus infections of aquatic mammals: newly
36 identified members of the genus. **Vet Microbiol**, v. 44, n. 2-4, p. 219-27, May 1995.
37 ISSN 0378-1135. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8588316> >.
38
- 39 PEPE, M. S.; THOMPSON, M. L. Combining diagnostic test results to increase
40 accuracy. **Biostatistics**, v. 1, n. 2, p. 123-40, Jun 2000. ISSN 1468-4357. Disponível
41 em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12933515> >.
42
- 43 PFEIFER, R. et al. Outcome after cardiac arrest: predictive values and limitations of
44 the neuroproteins neuron-specific enolase and protein S-100 and the Glasgow Coma
45 Scale. **Resuscitation**, v. 65, n. 1, p. 49-55, Apr 2005. ISSN 0300-9572. Disponível
46 em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15797275> >.
47
- 48 PLANCHE, V. et al. [Importance of hemolysis on neuron-specific enolase
49 measurement]. **Ann Biol Clin (Paris)**, v. 68, n. 2, p. 239-42, 2010 Mar-Apr 2010.
50 ISSN 0003-3898. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20348052> >.

1
2 PLATT, S.; GAROSI, L. Small Animal Neurological Emergencies. In: LTD, M. P. (Ed.).
3 **Infectious and Inflammatory Disease of the CNS**. 1. London, UK: Manson
4 Publishing Ltd, 2012. cap. Infectious and Inflammatory Disease of the CNS, p.341 -
5 362.

6
7 RECH, T. H.; VIEIRA, S. R.; BRAUNER, J. S. [Serum neuron-specific enolase as a
8 prognostic marker after a cardiac arrest]. **Rev Bras Ter Intensiva**, v. 18, n. 4, p. 396-
9 401, Dec 2006. ISSN 0103-507X. Disponível em: <
10 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25310555> >.

11
12 RECH, T. H. et al. Serum neuron-specific enolase as early predictor of outcome after
13 in-hospital cardiac arrest: a cohort study. **Crit Care**, v. 10, n. 5, p. R133, 2006. ISSN
14 1466-609X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16978415> >.

15
16 ROERIG, A. et al. Cerebrospinal fluid tau protein as a biomarker for severity of
17 spinal cord injury in dogs with intervertebral disc herniation. **Vet J**, v. 197, n. 2, p.
18 253-8, Aug 2013. ISSN 1532-2971. Disponível em: <
19 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23499240> >.

20
21 ROSÉN, H. et al. Serum levels of the brain-derived proteins S-100 and NSE predict
22 long-term outcome after cardiac arrest. **Resuscitation**, v. 49, n. 2, p. 183-91, May
23 2001. ISSN 0300-9572. Disponível em: <
24 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11382525> >.

25
26 SCHAARSCHMIDT, H.; PRANGE, H. W.; REIBER, H. Neuron-specific enolase
27 concentrations in blood as a prognostic parameter in cerebrovascular diseases.
28 **Stroke**, v. 25, n. 3, p. 558-65, Mar 1994. ISSN 0039-2499. Disponível em: <
29 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8128507> >.

30
31 SCHOERKHUBER, W. et al. Time course of serum neuron-specific enolase. A
32 predictor of neurological outcome in patients resuscitated from cardiac arrest.
33 **Stroke**, v. 30, n. 8, p. 1598-603, Aug 1999. ISSN 0039-2499. Disponível em: <
34 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10436107> >.

35
36 SILVA, M. C. et al. Neuropatologia da cinomose canina: 70 casos (2005-2008).
37 **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 29, p. 643-652, 2009. ISSN 0100-736X.
38 Disponível em: < [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-
39 736X2009000800008&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-736X2009000800008&nrm=iso) >.

40
41 SONNE, L. et al. Achados patológicos e imuno-histoquímicos em cães infectados
42 naturalmente pelo vírus da cinomose canina. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.
43 29, p. 143-149, 2009. ISSN 0100-736X. Disponível em: <
44 [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-
45 736X2009000200010&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-736X2009000200010&nrm=iso) >.

46
47 SUMMERS, B. A.; APPEL, M. J. Aspects of canine distemper virus and measles
48 virus encephalomyelitis. **Neuropathol Appl Neurobiol**, v. 20, n. 6, p. 525-34, Dec
49 1994. ISSN 0305-1846. Disponível em: <
50 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7898614> >.

1
2 THOMPSON, M. L.; ZUCCHINI, W. On the statistical analysis of ROC curves. **Stat**
3 **Med**, v. 8, n. 10, p. 1277-90, Oct 1989. ISSN 0277-6715. Disponível em: <
4 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2814075> >.

5
6 USUI, A. et al. Neural tissue-related proteins (NSE, G0 alpha, 28-kDa calbindin-D,
7 S100b and CK-BB) in serum and cerebrospinal fluid after cardiac arrest. **J Neurol**
8 **Sci**, v. 123, n. 1-2, p. 134-9, May 1994. ISSN 0022-510X. Disponível em: <
9 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8064306> >.

10
11 VIDOTTO, O. et al. Tratado de Medicina Interna de Cães e Gatos. In: JERICÓ, M.
12 M.;NETO, J. P. D. A., et al (Ed.). **Tratado de Medicina Interna de Cães e Gatos**. 1
13 ed. Rio de Janeiro, RJ: Editora Roca, v.1, 2015. cap. Toxoplasmose, p.703 - 712.

14
15 XUE, F. et al. Serum neuron specific enolase levels correlate with patient prognosis
16 for advanced lung cancer. **Int J Clin Exp Med**, v. 8, n. 6, p. 9498-504, 2015. ISSN
17 1940-5901. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26309614> >.

18
19 YAN, T. et al. Neuronal markers are expressed in human gliomas and NSE
20 knockdown sensitizes glioblastoma cells to radiotherapy and temozolomide. **BMC**
21 **Cancer**, v. 11, p. 524, 2011. ISSN 1471-2407. Disponível em: <
22 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22185371> >.

23
24 YANG, H. et al. Expression of neuron-specific enolase in multiple myeloma and
25 implications for clinical diagnosis and treatment. **PLoS One**, v. 9, n. 5, p. e94304,
26 2014. ISSN 1932-6203. Disponível em: <
27 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24796851> >.

28
29 YOKOBORI, S. et al. Biomarkers for the clinical differential diagnosis in traumatic
30 brain injury--a systematic review. **CNS Neurosci Ther**, v. 19, n. 8, p. 556-65, Aug
31 2013. ISSN 1755-5949. Disponível em: <
32 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23710877> >.

33
34 YOSHIDA, Y. et al. Changes in levels of translatable mRNA for neuron-specific
35 enolase and non-neuronal enolase during development of rat brain and liver. **J**
36 **Biochem**, v. 94, n. 5, p. 1443-50, Nov 1983. ISSN 0021-924X. Disponível em: <
37 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6654865> >.

38
39 ZENAIDE, P. V.; GUSMAO-FLORES, D. Biomarkers in septic encephalopathy: a
40 systematic review of clinical studies. **Rev Bras Ter Intensiva**, v. 25, n. 1, p. 56-62,
41 Mar 2013. ISSN 1982-4335. Disponível em: <
42 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23887761> >.

43
44
45
46
47
48

5 ARTIGO NAS NORMAS DO PERIÓDICO INTITULADO BRAIN RESEARCH

COMPARISON OF SERUM VALUES OF NEURON-SPECIFIC ENOLASE (NSE) IN DOGS WITH AND WITHOUT ENCEPHALITIS

ABSTRACT

The neuron-specific enolase (NSE) is a biomarker resultant of the neuronal cell lysis, which demonstrates stability in extracellular fluids such as blood and cerebrospinal fluid. The measurement of NSE in serum samples from human were efficient, demonstrating reliability to distinguish and estimate the central nervous system damage in cases of encephalitis. In veterinary medicine, dogs with meningoencephalitis showed increased levels of NSE in cerebrospinal fluid, however, there are no studies evaluating the expression of NSE in serum samples from dogs with encephalitis. Thus, the objectives of this study was to compare the values of serum NSE in dogs with and without encephalitis and to evaluate. For this, we used 38 dogs in total, divided into two groups, 19 dogs with encephalitis (GE) and 19 dogs without encephalitis (GS). The criteria for inclusion in to the GS were aged 1 to 7 years, with normal clinical and laboratory tests. For the GE inclusion, criteria were dogs with neurological symptoms brain injury, positive molecular diagnosis for distemper, and no symptoms of hemolysis. Regarding the results obtained it was found that for the GE serum NSE values higher with greater variation, and higher mean and median GS, there was a significant difference between the groups ($p = 0.0053$). In conclusion, the NSE can be measured in serum samples of dogs, and occurred a significant difference between the groups, contributing to the validation of serum NSE as a biomarker to help in the evaluation of dogs with encephalitis.

Key words: brain, biomarkers, distemper.

1. INTRODUÇÃO

A enolase neuronal específica (NSE – neuronal specific enolase) é uma enzima glicolítica intracitoplasmática encontrada nos neurônios e nas células neuroendócrinas (Marangos and Schmechel, 1987), considerada um dos principais biomarcadores de lesão de neurônios estudados na medicina humana (Yokobori et al., 2013), porém, na medicina veterinária há poucos estudos (Nishida, 2014). Ela pode ser encontrada no líquido cerebrospinal (LCE) e no soro, e, atualmente, é pesquisada como fator de predição e prognóstico em diversos trabalhos na medicina humana (Chabok et al., 2012; Fendler et al., 2015; Xue et al., 2015). Entretanto, a elevação dos níveis séricos de NSE pode ser menor em relação ao LCE, pela função barreira hematoencefálica (BHE), sendo que, em casos inflamatórios e infecciosos com caráter agudo há valores próximos em ambas as amostras (Lima et al., 2004). Os eritrócitos e as plaquetas também possuem NSE, portanto, nos trabalhos com intuito de avaliar danos neuronais é necessário descartar hemólise minimizando interferências nas mensurações séricas (Day and Thompson, 1984; Planche et al., 2010).

1 Em um estudo que comparou os resultados de análise proteômica de LCE de grupos de cães
2 saudáveis com os que possuíam diagnóstico de meningoencefalites de origem desconhecida, observou-
3 se que a NSE estava presente em ambos os grupos, porém em maior quantidade no grupo com
4 meningoencefalites (Nakamura et al., 2012). Entretanto, esses resultados não sugerem que o
5 biomarcador possa ser utilizado como método de diagnóstico, pois a NSE está relacionada às lesões
6 por encefalite e não à etiologia especificamente. Assim como é demonstrado em uma pesquisa
7 avaliando biomarcadores em cães com gangliosidosis, doença neurodegenerativa de caráter crônico
8 progressiva, em que evidenciaram valores de NSE no LCE maiores do que os controles, sugerindo que
9 o biomarcador foi eficiente para monitorar as lesões no encefálo (Satoh et al., 2007). Ainda que a
10 maioria dos estudos avaliando a NSE em cães utilizem amostras de LCE, há um experimento com cães
11 submetidos a parada circulatória para se estimar o dano cerebral mediante o uso de biomarcadores,
12 através de amostras séricas e de LCE. Observou-se que os valores de NSE no LCE e no soro se
13 elevaram uma hora e duas horas após o restabelecimento da circulação, respectivamente (Usui et al.,
14 1994)

15 No Brasil a prevalência de encefalite por cinomose em cães é alta (Figuera et al., 2008; Sonne
16 et al., 2009), sendo que as manifestações patológicas no SNC podem ser variadas e são denominadas
17 como: encefalite dos cães jovens; encefalite dos cães adultos; encefalite dos cães velhos; encefalite
18 pós-vacinal; poli-encefalite com corpusculos de inclusão da cinomose (HEADLEY and GRAÇA,
19 2000; Headley et al., 2009; Headley et al., 2012; Summers et al., 1984). Os sintomas neurológicos
20 ocasionados pelo vírus podem ser variáveis de acordo com a localização da lesão (Summers et al.,
21 1984) e a resposta imunológica (Beineke et al., 2009). Além disso, a cinomose na fase aguda pode
22 induzir a imunossupressão, devido à ação direta em células CD4+, tornando os cães acometidos
23 suscetíveis a infecções secundárias, exemplo os protozoários neurotrópicos como *Toxoplasma gondii* e
24 *Neospora caninum* (Beineke et al., 2009; Greene and Vandeveld, 2012).

25 Nesse presente estudo, assumiu-se a possibilidade de que cães com encefalite por cinomose
26 apresentem coinfeções e expressem o biomarcador NSE no sangue, e que quando comparado valores
27 mensurados no soro de cães sem e com encefalite apresentem diferença significativa. Sugerindo desta
28 forma que a NSE seja um biomarcador de lesões no SNC em casos de encefalite, utilizando amostras
29 séricas. Deste modo, o presente trabalho tem como objetivo avaliar o teste para detecção de NSE em
30 humanos (Neuron-Specific Enolase ELISA, número de catálogo 43-NSEHU-E01 (ALPCO®)), a fim
31 de quantificar a NSE sérica em cães com e sem encefalite e comparar os valores obtidos.

32

33

2. RESULTADOS

2.1. NSE sérica

A comparação dos valores de NSE entre os grupos apresentou diferença significativa ($P = 0,0053$) conforme demonstrado na Figura 1, ou seja, no GS os resultados da NSE foram: média +- SD = 10,43 +- 5,94 ng/ml, mediana = 8,53 ng/ml, e no GE foram: média +- SD = 71,73 +- 104,2 ng/ml, mediana = 26 ng/ml), conforme os dados apresentados na Tabela 1. Quando se comparou os valores de NSE entre os indivíduos do mesmo grupo em relação ao sexo, não houve diferença significativa nos valores de NSE em machos (GS: média +- SD = 11,84 +- 7,39 ng/ml, mediana = 7,39 ng/ml; GE: média +- SD = 44,62 +- 64,46 ng/ml, mediana = 20,3 ng/ml) e fêmeas (GS: média +- SD = 9,62 +- 5,09 ng/ml, mediana = 8,88 ng/ml; GE: média +- SD = 87,54 +- 121,49 ng/ml, mediana = 34,29 ng/ml; GS: $P = 0,50$; GE: $P = 0,33$) dos grupos.

2.2. ENCEFALITES

No GE o diagnóstico neuroanatômico por meio do exame neurológico foi multifocal em todos os casos, sendo observado que: seis (32 %) apresentaram lesão do prosencéfalo e tronco encefálico; quatro (21 %) com lesão em prosencéfalo, tronco encefálico e medula espinhal; três (16 %) com lesão no tronco encefálico e medula espinhal; dois (11 %) com lesão em prosencéfalo e medula espinhal; dois (11 %) com lesão em prosencéfalo, medula espinhal e cerebelo; um (5 %) com lesão em prosencéfalo, tronco encefálico e cerebelo e um (5 %) com lesão em prosencéfalo e cerebelo. Para o diagnóstico molecular de cinomose foram utilizadas 11 amostras de urina e 8 amostras de sangue em EDTA, todos foram positivos.

A avaliação de LCE foi realizada em sete cães cujos proprietários solicitaram eutanásia. A coleta foi realizada com o consentimento dos mesmos, e imediatamente após o procedimento. Desse cães cinco (71%) apresentaram pleocitose linfocítica, e em todos foi observado hiperproteínoorraquia.

3. DISCUSSÃO

Os resultados do trabalho indicam que o teste para detecção de NSE em humanos foi eficaz na mensuração do biomarcador em soro de cães, e que a NSE apresentou valores maiores nos cães com encefalite quando comparada aos cães sem encefalite. O GE apresentou valores de NSE maiores e variados entre si quando comparados aos do GS, com diferença significativa ($P=0,0053$) entre os grupos. Esses resultados demonstram que a NSE sérica pode ser utilizada como indicador de lesão encefálica em cães, nos casos de encefalites por cinomose, estando em concordância com os achados

1 descritos em seres humanos (Lima et al., 2004). O GE apresentou alguns valores de NSE similares ao
2 GS, ou seja, semelhantes à média e mediana do GS demonstrados na Figura 1. Desta forma o uso de
3 amostras séricas, foi eficaz no auxílio ao diagnóstico de encefalite, e que por se tratar de amostras
4 periféricas não acrescentam riscos ao procedimento de coleta, possibilitando avaliações pareadas de
5 forma minimamente invasiva. Esses dados reforçam a utilização da NSE sérica para monitoramento de
6 patologias no SNC, semelhante ao ocorrido em outros estudos de cães com lesões encefálicas, que
7 sugerem que o biomarcador possa ser usado para monitorar a progressão de uma doença por meio de
8 amostras de LCE (Nakamura et al., 2012; Satoh et al., 2007).

9 Devido a alta especificidade da NSE em relação a substância cinzenta (Marangos and
10 Schmechel, 1987), lesões de substância branca não seriam expressadas pelo biomarcador, o que
11 poderia ser uma justificativa para a variação dos valores da NSE no GE. Além disso, o fato de uma
12 única amostra de sangue/urina ter sido obtida no momento do primeiro atendimento ambulatorial sem
13 avaliações posteriores em relação à NSE, não permitiu estabelecer se a doença estava em fase aguda
14 ou crônica, desse modo a expressão de NSE no soro estaria relacionada à continuidade da morte de
15 neurônios, com contínua liberação do biomarcador, ou ainda com o comprometimento da BHE, Deve-
16 se também considerar que o tempo de depuração da proteína no sangue sugere um processo
17 acumulativo (Usui et al., 1994).

18 Pelo fato da NSE ser um subproduto do metabolismo de enzimas glicolíticas
19 intracitoplasmática de neurônios, e é liberada quando há o processo de escassez de energia e
20 consequente citólise destas células (Marangos et al., 1980), associados a variabilidade dos resultados
21 obtidos com pacientes apresentando valores elevados de NSE, corroboram com a especificidade do
22 biomarcador testado por neurônios, estando mais uma vez de acordo com o observado por Lima et al
23 (2004) em estudo envolvendo seres humanos com encefalite.

24 25 **3.1. Conclusões**

26
27 Com esse estudo podemos concluir que o teste de ELISA para detecção de NSE para humanos
28 pode ser utilizado para mensurar o biomarcador em soro de cães, e que há diferença entre os valores de
29 pacientes com e sem encefalite causada pelo vírus da cinomose, validando a aplicação da NSE sérica
30 como biomarcador de auxílio na avaliação de cães com encefalite.

31 32 **4. PROCEDIMENTOS DO EXPERIMENTO**

33
34 No presente estudo, foram utilizados 38 cães (*Canis familiaris*, Lineu 1758) oriundos do
35 Serviço de Clínica Médica de Animais de Companhia do Hospital Veterinário Escola da Universidade
36 Estadual de Londrina, distribuídos em dois grupos: o grupo sem encefalite (GS), e o grupo com

1 encefalite (GE), ambos composto por 19 cães. Os animais do GS foram atendidos para avaliações de
2 controle sem qualquer patologia ou queixa clínica.

3 Os critérios para inclusão dos cães no GS foram: idade entre 1 e 7 anos, sem alterações
4 clínicas e laboratoriais (hemograma, creatinina, uréia, glicose, alanina-amino-transferase, fosfatase
5 alcalina). Para o GE os critérios foram: cães com sintomas neurológicas multifocais como por
6 exemplo comportamento inapropriado, diminuição da consciência, torção de cabeça, pleurotótono,
7 nistagmo e paresia, com diagnóstico molecular (RT-PCR para o gene N do vírus da cinomose)
8 positivo para cinomose. Foram coletados para este grupo uma amostra de sangue venoso, e urina
9 quando disponível e LCE por punção da cisterna magna dos cães eutanasiados a pedido do
10 proprietário. O tempo entre coleta, processamento e estocagem das amostras em ambos os grupos não
11 ultrapassou 60 minutos. Não foram utilizadas amostras de soro com aspecto de hemólise. Não houve
12 restrição para sexo e raça em ambos os grupos. Este trabalho foi aprovado pela Comissão de Ética no
13 Uso de Animais da Universidade Estadual de Londrina com número de ofício 086/14.

14 **4.1.Mensuração da NSE no soro**

15
16
17 Para a determinação dos valores de NSE por meio da técnica de ELISA, foram utilizados soros
18 armazenados a -80 °C. O processamento das amostras dos cães foi realizado em duplicata em etapa
19 única, assim como as amostras padrões e de controle do kit, seguindo as orientações do teste comercial
20 Neuron Specific Enolase 43-NSEHU-E01 (ALPCO®), para seres humanos.

21 **4.2.Caracterização de encefalite**

22
23
24 O quadro clínico de encefalite foi caracterizado pela realização do exame neurológico e
25 identificação de sinais neurológicos multifocais, ou seja, presença de mais de uma das alterações
26 descritas a seguir: alteração de consciência, mudança de comportamento, torção de cabeça,
27 pleurotótono, opstótono, convulsão, amaurose, estrabismo, nistagmo, ataxia, tetraparesia e paraparesia.
28 Por meio do exame neurológico, realizado no momento da coleta de amostras biológicas, foi possível
29 associar os sintomas às estruturas do SNC acometidas. Além disso, a presença do vírus da cinomose
30 foi confirmada em amostras de urina e/ou sangue acondicionado em EDTA utilizando-se a técnica de
31 reação em cadeia da polimerase (PCR), com primer designado para amplificar um fragmento do gene
32 N da cinomose (Frisk et al., 1999), como descrito em Boom et al (1990) e modificado por Amude et
33 al (2006).

4.3. Análise estatística

O teste de *Kruskal-Wallis* foi utilizado para analisar a diferença entre as médias de NSE entre os grupos GS e GE, com nível de significância de 5 % ($p < 0,05$). O teste *t* foi utilizado para avaliar as demais comparações, com o mesmo nível de significância.

REFERÊNCIAS

- Alldinger, S., Gröters, S., Miao, Q., Fonfara, S., Kremmer, E., Baumgärtner, W., 2006. Roles of an extracellular matrix (ECM) receptor and ECM processing enzymes in demyelinating canine distemper encephalitis. *Dtsch Tierärztl Wochenschr.* 113, 151-2, 154-6.
- Amude, A.M., Alfieri, A.A., Alfieri, A.F., 2006. Antemortem diagnosis of CDV infection by RT-PCR in distemper dogs with neurological deficits without the typical clinical presentation. *Vet Res Commun.* 30, 679-87.
- Beineke, A., Puff, C., Seehusen, F., Baumgärtner, W., 2009. Pathogenesis and immunopathology of systemic and nervous canine distemper. *Vet Immunol Immunopathol.* 127, 1-18.
- Castilho, J.G., Brandão, P.E., Carnieli Jr, P., Oliveira, R.N., Macedo, C.I., Peixoto, Z.M.P., Carrieri, M.L., Kotait, I., 2007. Molecular analysis of the N gene of canine distemper virus in dogs in Brazil. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia.* 59, 654-659.
- Cata, J.P., Abdelmalak, B., Farag, E., 2011. Neurological biomarkers in the perioperative period. *Br J Anaesth.* 107, 844-58.
- Chabok, S.Y., Moghadam, A.D., Saneei, Z., Amlashi, F.G., Leili, E.K., Amiri, Z.M., 2012. Neuron-specific enolase and S100BB as outcome predictors in severe diffuse axonal injury. *J Trauma Acute Care Surg.* 72, 1654-7.
- Day, I.N., Thompson, R.J., 1984. Levels of immunoreactive aldolase C, creatine kinase-BB, neuronal and non-neuronal enolase, and 14-3-3 protein in circulating human blood cells. *Clin Chim Acta.* 136, 219-28.
- Ek-Kommonen, C., Sihvonen, L., Pekkanen, K., Rikula, U., Nuotio, L., 1997. Outbreak of canine distemper in vaccinated dogs in Finland. *Vet Rec.* 141, 380-3.
- Fendler, W.P., Wenter, V., Thornton, H.I., Ilhan, H., von Schweinitz, D., Coppenrath, E., Schmid, I., Bartenstein, P., Pfluger, T., 2015. Combined Scintigraphy and Tumor Marker Analysis Predicts Unfavorable Histopathology of Neuroblastic Tumors with High Accuracy. *PLoS One.* 10, e0132809.
- Figuera, R.A., Souza, T.M., Silva, M.C., Brum, J.S., Graça, D.L., Kommers, G.D., Irigoyen, L.F., Barros, C.S.L., 2008. Causas de morte e razões para eutanásia de cães da Mesorregião do Centro Ocidental Rio-Grandense (1965-2004). *Pesquisa Veterinária Brasileira.* 28, 223-230.

- 1 Fletcher, L., Rider, C.C., Taylor, C.B., 1976. Enolase isoenzymes. III.
2 Chromatographic and immunological characteristics of rat brain enolase.
3 *Biochim Biophys Acta.* 452, 245-52.
- 4 Frisk, A.L., König, M., Moritz, A., Baumgärtner, W., 1999. Detection of canine
5 distemper virus nucleoprotein RNA by reverse transcription-PCR using serum,
6 whole blood, and cerebrospinal fluid from dogs with distemper. *J Clin*
7 *Microbiol.* 37, 3634-43.
- 8 Greene, C.E., Vandevelde, M., 2012. Infectious Diseases of the Dog and Cat. In
9 Infectious Diseases of the Dog and Cat. Vol. 4Th ed, C.E. Greene, ed.^eds.
10 Elsevier Inc, St Louis, Missouri, pp. 25 - 42.
- 11 Hajduková, L., Sobek, O., Prchalová, D., Bílková, Z., Koudelková, M., Lukášková, J.,
12 Matuchová, I., 2015. Biomarkers of Brain Damage: S100B and NSE
13 Concentrations in Cerebrospinal Fluid-A Normative Study. *Biomed Res Int.*
14 2015, 379071.
- 15 Hartmann, T.L.S., Batista, H.B.d.C.R., Dezen, D., Spilki, F.R., Franco, A.C., Roehe,
16 P.M., 2007. Anticorpos neutralizantes contra os vírus da cinomose e da
17 parainfluenza em cães de canis dos municípios de Novo Hamburgo e Porto
18 Alegre, RS, Brasil. *Ciência Rural.* 37, 1178-1181.
- 19 HEADLEY, S.A., GRAÇA, D.L., 2000. Canine distemper: epidemiological findings of
20 250 cases. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science.* 37,
21 00-00.
- 22 Headley, S.A., Amude, A.M., Alfieri, A.F., Bracarense, A.P., Alfieri, A.A., Summers,
23 B.A., 2009. Molecular detection of Canine distemper virus and the
24 immunohistochemical characterization of the neurologic lesions in naturally
25 occurring old dog encephalitis. *J Vet Diagn Invest.* 21, 588-97.
- 26 Headley, S.A., Amude, A.M., Alfieri, A.F., Bracarense, A.P.F.R.L., Alfieri, A.A., 2012.
27 Epidemiological features and the neuropathological manifestations of canine
28 distemper virus-induced infections in Brazil: a review *Semina: Ciências*
29 *Agrárias.* 33, 1945 - 1978.
- 30 Howell, D.G., 1965. Immunization of the Dog. *Can Vet J.* 6, 127-36.
- 31 Inomata, M., Hayashi, R., Yamamoto, A., Tokui, K., Taka, C., Okazawa, S.,
32 Kambara, K., Suzuki, K., Ichikawa, T., Yamada, T., Miwa, T., Kashii, T.,
33 Matsui, S., Tobe, K., Imura, J., 2015. Plasma neuron-specific enolase level as
34 a prognostic marker in patients with non-small cell lung cancer receiving
35 gefitinib. *Mol Clin Oncol.* 3, 802-806.
- 36 Johnsson, P., Blomquist, S., Lührs, C., Malmkvist, G., Alling, C., Solem, J.O., Ståhl,
37 E., 2000. Neuron-specific enolase increases in plasma during and immediately
38 after extracorporeal circulation. *Ann Thorac Surg.* 69, 750-4.
- 39 Kato, K., Suzuki, F., Watanabe, T., Semba, R., Keino, H., 1984. Developmental
40 profile of three enolase isozymes in rat brain determination from one-cell
41 embryo to adult brain. *Neurochem Int.* 6, 51-4.
- 42 Kewal, J.K., 2010. Introduction. In *The Handbook of Biomarkers.* Vol. 1, J.K. Kewal,
43 ed.^eds. Springer, New York, NY, pp. 1 - 20.
- 44 Levine, G.J., Levine, J.M., Witsberger, T.H., Kerwin, S.C., Russell, K.E., Suchodolski,
45 J., Steiner, J., Fosgate, G.T., 2010. Cerebrospinal fluid myelin basic protein as
46 a prognostic biomarker in dogs with thoracolumbar intervertebral disk
47 herniation. *J Vet Intern Med.* 24, 890-6.
- 48 Lima, J.E., Takayanagui, O.M., Garcia, L.V., Leite, J.P., 2004. Use of neuron-specific
49 enolase for assessing the severity and outcome in patients with neurological
50 disorders. *Braz J Med Biol Res.* 37, 19-26.

- 1 MACLACHLAN, N.J., DUBOVI, E.J., 2011. Paramyxoviridae. In Fenner's veterinary
2 virology. Vol., A. Press, ed. eds. Academic Press, California, San Diego pp.
3 299-325.
- 4 Marangos, P.J., Zis, A.P., Clark, R.L., Goodwin, F.K., 1978. Neuronal, non-neuronal
5 and hybrid forms of enolase in brain: structural, immunological and functional
6 comparisons. *Brain Res.* 150, 117-33.
- 7 Marangos, P.J., Schmechel, D.E., Parma, A.M., Goodwin, F.K., 1980. Developmental
8 profile of neuron-specific (NSE) and non-neuronal (NNE) enolase. *Brain Res.*
9 190, 185-93.
- 10 Marangos, P.J., Schmechel, D.E., 1987. Neuron specific enolase, a clinically useful
11 marker for neurons and neuroendocrine cells. *Annu Rev Neurosci.* 10, 269-95.
- 12 Mariani, C.L., Boozer, L.B., Braxton, A.M., Platt, S.R., Vernau, K.M., McDonnell, J.J.,
13 Guevar, J., 2013. Evaluation of matrix metalloproteinase-2 and -9 in the
14 cerebrospinal fluid of dogs with intracranial tumors. *Am J Vet Res.* 74, 122-9.
- 15 Maxwell, G.D., Whitehead, M.C., Connolly, S.M., Marangos, P.J., 1982. Development
16 of neuron-specific enolase immunoreactivity in avian nervous tissue in vivo
17 and in vitro. *Brain Res.* 255, 401-18.
- 18 Mayeux, R., 2004. Biomarkers: potential uses and limitations. *NeuroRx.* 1, 182-8.
- 19 Miyake, H., Inoue, A., Tanaka, M., Matsuki, N., 2013. Serum glial fibrillary acidic
20 protein as a specific marker for necrotizing meningoencephalitis in Pug dogs. *J*
21 *Vet Med Sci.* 75, 1543-5.
- 22 Naeger, D.M., Kohi, M.P., Webb, E.M., Phelps, A., Ordovas, K.G., Newman, T.B.,
23 2013. Correctly using sensitivity, specificity, and predictive values in clinical
24 practice: how to avoid three common pitfalls. *AJR Am J Roentgenol.* 200,
25 W566-70.
- 26 Nakamura, K., Miyasho, T., Nomura, S., Yokota, H., Nakade, T., 2012. Proteome
27 analysis of cerebrospinal fluid in healthy beagles and canine encephalitis. *J*
28 *Vet Med Sci.* 74, 751-6.
- 29 Negrão, F.J., Wosiacki, S.H., Alfieri, A.A., Alfieri, A.F., 2006. Perfil de restrição de um
30 fragmento do gene da hemaglutinina amplificado pela RT-PCR a partir de
31 estirpes vacinais e selvagens do vírus da cinomose canina. *Arquivo Brasileiro*
32 *de Medicina Veterinária e Zootecnia.* 58, 1099-1106.
- 33 Nessler, A., Baumgärtner, W., Zurbriggen, A., Orvell, C., 1999. Restricted virus
34 protein translation in canine distemper virus inclusion body polyencephalitis.
35 *Vet Microbiol.* 69, 23-8.
- 36 Nishida, H., 2014. Biomarkers for neural injury and infection in small animals. *Vet*
37 *Clin North Am Small Anim Pract.* 44, 1187-99.
- 38 Nishida, H., Nakayama, M., Tanaka, H., Kamishina, H., Izawa, T., Hatoya, S.,
39 Sugiura, K., Suzuki, Y., Ide, C., Inaba, T., 2014. Evaluation of serum
40 phosphorylated neurofilament subunit NF-H as a prognostic biomarker in dogs
41 with thoracolumbar intervertebral disc herniation. *Vet Surg.* 43, 289-93.
- 42 Osterhaus, A.D., de Swart, R.L., Vos, H.W., Ross, P.S., Kenter, M.J., Barrett, T.,
43 1995. Morbillivirus infections of aquatic mammals: newly identified members of
44 the genus. *Vet Microbiol.* 44, 219-27.
- 45 Pepe, M.S., Thompson, M.L., 2000. Combining diagnostic test results to increase
46 accuracy. *Biostatistics.* 1, 123-40.
- 47 Pfeifer, R., Börner, A., Krack, A., Sigusch, H.H., Surber, R., Figulla, H.R., 2005.
48 Outcome after cardiac arrest: predictive values and limitations of the
49 neuroproteins neuron-specific enolase and protein S-100 and the Glasgow
50 Coma Scale. *Resuscitation.* 65, 49-55.

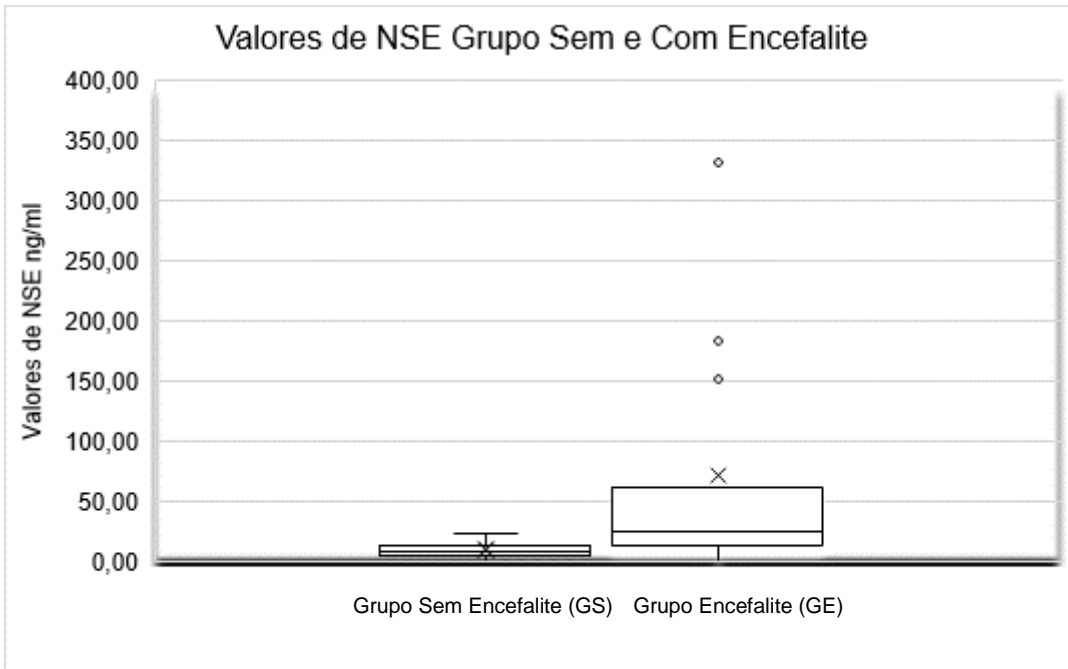
- 1 Planche, V., Brochet, C., Bakkouch, A., Bernard, M., 2010. [Importance of hemolysis
2 on neuron-specific enolase measurement]. *Ann Biol Clin (Paris)*. 68, 239-42.
- 3 Platt, S., Garosi, L., 2012. Small Animal Neurological Emergencies. In *Infectious and
4 Inflammatory Disease of the CNS*. Vol., M.P. Ltd, ed. eds. Manson Publishing
5 Ltd, London, UK, pp. 341 - 362.
- 6 Rech, T.H., Vieira, S.R., Brauner, J.S., 2006a. [Serum neuron-specific enolase as a
7 prognostic marker after a cardiac arrest]. *Rev Bras Ter Intensiva*. 18, 396-401.
- 8 Rech, T.H., Vieira, S.R., Nagel, F., Brauner, J.S., Scalco, R., 2006b. Serum neuron-
9 specific enolase as early predictor of outcome after in-hospital cardiac arrest:
10 a cohort study. *Crit Care*. 10, R133.
- 11 Roerig, A., Carlson, R., Tipold, A., Stein, V.M., 2013. Cerebrospinal fluid tau protein
12 as a biomarker for severity of spinal cord injury in dogs with intervertebral disc
13 herniation. *Vet J*. 197, 253-8.
- 14 Rosén, H., Sunnerhagen, K.S., Herlitz, J., Blomstrand, C., Rosengren, L., 2001.
15 Serum levels of the brain-derived proteins S-100 and NSE predict long-term
16 outcome after cardiac arrest. *Resuscitation*. 49, 183-91.
- 17 Satoh, H., Yamato, O., Asano, T., Yonemura, M., Yamauchi, T., Hasegawa, D.,
18 Orima, H., Arai, T., Yamasaki, M., Maede, Y., 2007. Cerebrospinal fluid
19 biomarkers showing neurodegeneration in dogs with GM1 gangliosidosis:
20 possible use for assessment of a therapeutic regimen. *Brain Res*. 1133, 200-8.
- 21 Schaarschmidt, H., Prange, H.W., Reiber, H., 1994. Neuron-specific enolase
22 concentrations in blood as a prognostic parameter in cerebrovascular
23 diseases. *Stroke*. 25, 558-65.
- 24 Schoerhuber, W., Kittler, H., Sterz, F., Behringer, W., Holzer, M., Frossard, M.,
25 Spitzauer, S., Laggner, A.N., 1999. Time course of serum neuron-specific
26 enolase. A predictor of neurological outcome in patients resuscitated from
27 cardiac arrest. *Stroke*. 30, 1598-603.
- 28 Silva, M.C., Figuera, R.A., Mazzanti, A., Brum, J.S., Pierezan, F., Barros, C.S.L.,
29 2009. Neuropatologia da cinomose canina: 70 casos (2005-2008). *Pesquisa
30 Veterinária Brasileira*. 29, 643-652.
- 31 Sonne, L., Oliveira, E.C., Pescador, C.A., Santos, A.S., Pavarini, S.P., Carissimi,
32 A.S., Driemeier, D., 2009. Achados patológicos e imuno-histoquímicos em
33 cães infectados naturalmente pelo vírus da cinomose canina. *Pesquisa
34 Veterinária Brasileira*. 29, 143-149.
- 35 Summers, B.A., Greisen, H.A., Appel, M.J., 1984. Canine distemper
36 encephalomyelitis: variation with virus strain. *J Comp Pathol*. 94, 65-75.
- 37 Summers, B.A., Appel, M.J., 1994. Aspects of canine distemper virus and measles
38 virus encephalomyelitis. *Neuropathol Appl Neurobiol*. 20, 525-34.
- 39 Thompson, M.L., Zucchini, W., 1989. On the statistical analysis of ROC curves. *Stat
40 Med*. 8, 1277-90.
- 41 Usui, A., Kato, K., Murase, M., Hotta, T., Tanaka, M., Takeuchi, E., Abe, T., 1994.
42 Neural tissue-related proteins (NSE, G0 alpha, 28-kDa calbindin-D, S100b and
43 CK-BB) in serum and cerebrospinal fluid after cardiac arrest. *J Neurol Sci*.
44 123, 134-9.
- 45 Xue, F., Zhu, L., Wang, L., Wang, Q., 2015. Serum neuron specific enolase levels
46 correlate with patient prognosis for advanced lung cancer. *Int J Clin Exp Med*.
47 8, 9498-504.
- 48 Yan, T., Skaftnesmo, K.O., Leiss, L., Sleire, L., Wang, J., Li, X., Enger, P., 2011.
49 Neuronal markers are expressed in human gliomas and NSE knockdown

1 sensitizes glioblastoma cells to radiotherapy and temozolomide. BMC Cancer.
2 11, 524.

3 Yang, H., Mi, R., Wang, Q., Wei, X., Yin, Q., Chen, L., Zhu, X., Song, Y., 2014.
4 Expression of neuron-specific enolase in multiple myeloma and implications
5 for clinical diagnosis and treatment. PLoS One. 9, e94304.

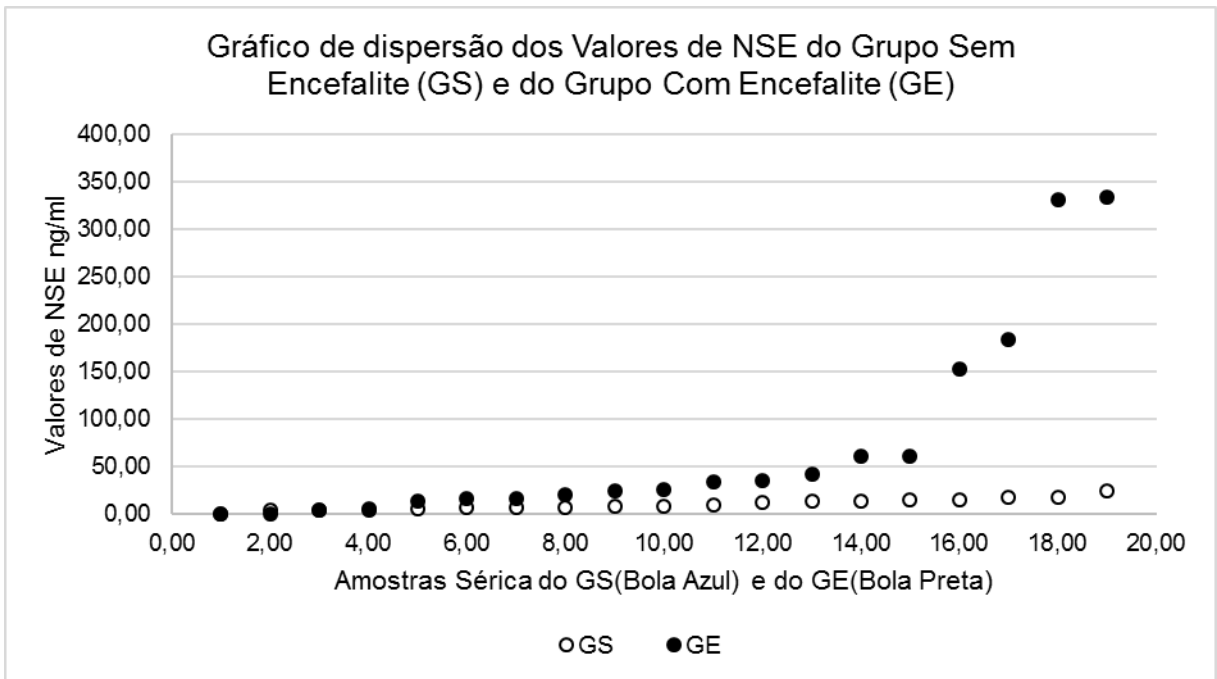
6 Yokobori, S., Hosein, K., Burks, S., Sharma, I., Gajavelli, S., Bullock, R., 2013.
7 Biomarkers for the clinical differential diagnosis in traumatic brain injury--a
8 systematic review. CNS Neurosci Ther. 19, 556-65.

9 Yoshida, Y., Sakimura, K., Masuda, T., Kushiya, E., Takahashi, Y., 1983. Changes in
10 levels of translatable mRNA for neuron-specific enolase and non-neuronal
11 enolase during development of rat brain and liver. J Biochem. 94, 1443-50.
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40



1
2
3
4
5
6

Figura 1 – Gráfico em forma de caixas, apresentando os valores de NSE sérica no grupo sem encefalite (GS) e grupo com encefalite (GE) com três outliers neste grupo representados por ◊.



1 Tabela 1 – Resumo da análise estatística das 19 amostras de soro dos cães do GS e do GE com média,
 2 desvio padrão e mediana dos valores de NSE e diferença entre os grupos utilizando o teste de
 3 *Kruskal-Wallis*, processadas em julho de 2015 na Universidade Estadual de Londrina.

Grupo	NSE (ng/ml)		P
	Média +- SD	Mediana	
GS	10,43 +- 5,94	8,53	0,005299
GE	71,73 +- 104,2	26	

4 Grupo sem encefalite (GS)
 5 Grupo com encefalite (GE)
 6 Desvio Padrão (+- SD)
 7 Valor de p utilizando o teste de *Kruskal-Wallis* (P)

8
 9
 10
 11
 12
 13
 14
 15
 16
 17
 18
 19
 20
 21
 22
 23
 24
 25
 26
 27
 28
 29
 30

1 Tabela 2 – Tabela apresentando a resenha, diagnóstico neuroanatômico, análise de LCE e valores de
 2 NSE dos 19 cães do grupo com encefalite (GE), obtidos no período de julho de 2014 a julho de 2015,
 3 na Universidade Estadual de Londrina.

Resenha	Diagnostico Neuroanatomico	LCR	NSE
1,8 anos, F, SRD	Multifocal - Prosencéfalo, Tronco Cerebral e medula espinhal	Pleocitose Linfocitica + hiperproteínoorraquia	0,00
1,8 anos, F, SRD	Multifocal - Prosencéfalo e Cerebelo	Hiperproteínoorraquia	0,00
6 meses, M, SRD	Multifocal - Prosencéfalo e Medula espinhal		3,78
2 anos, M, Fila Brasileiro	Multifocal - Prosencéfalo, Tronco Cerebral e medula espinhal		4,99
6 anos, M, SRD	Multifocal - Prosencéfalo, Medula espinhal e cerebelo	Pleocitose Linfocitica + hiperproteínoorraquia	13,53
2,5 anos, F, SRD	Multifocal - Tronco Cerebral e medula espinhal		16,44
1,1 anos, F, SRD	Multifocal - Prosencéfalo, Tronco Cerebral e medula espinhal		16,63
10 anos, M, SRD	Multifocal - Tronco Cerebral e Medula espinhal	Pleocitose Linfocitica + hiperproteínoorraquia	20,30
7 Anos, M, Boxer	Multifocal - Prosencéfalo e Tronco Cerebral		24,61
10 anos, F, SRD	Multifocal - Prosencéfalo e Tronco Cerebral		26,00
7 anos, F, SRD	Multifocal - Prosencéfalo e Tronco Cerebral		33,47
2,5 meses, F, SRD	Multifocal - Prosencéfalo, Tronco Cerebral e Cerebelo	Pleocitose Linfocitica + hiperproteínoorraquia	35,11
1, 4 anos, F, SRD	Multifocal - Tronco Cerebral e Medula espinhal	Hiperproteínoorraquia	42,46
1, 7 anos, M, Labrador	Multifocal - Prosencéfalo e Tronco Cerebral		61,00
2 A, F, SRD	Multifocal - Prosencéfalo, Tronco Cerebral e Medula espinhal		61,51
1 Ano, F, SRD	Multifocal - Prosencéfalo, Medula espinhal e cerebelo		152,84
2,5 anos, M, SRD	Multifocal - Prosencéfalo e Medula espinhal		184,16
1 ano, F, Lhasa Apso	Multifocal - Prosencéfalo e Tronco Cerebral		331,89
5 meses, F, SRD	Multifocal - Prosencéfalo e Tronco Cerebral	Pleocitose Linfocitica + hiperproteínoorraquia	334,16
			X = 71,73

4 LCE – Líquido cerebrospinal; NSE – Enolase neuronal específica.

5

1 6 CONCLUSÃO

2
3 - Perante o exposto julga-se poder concluir que o teste de ELISA para
4 quantificação da NSE em humanos, pode ser utilizado de forma eficaz na mensuração da NSE
5 sérica em cães.

6
7 - Cães com encefalite por cinomose, apresentaram valores de NSE elevados
8 quando comparados a cães sem encefalite.

9
10 - A NSE sérica pode ser utilizada como um biomarcador de lesão neuronal
11 em cães, assim como a expressão sérica do biomarcador. Contudo, a viabilidade do
12 biomarcador como preditor para cães com encefalite necessita de mais estudos, assim como
13 outras aplicações clínicas.

14 -
15
16

1

ANEXOS

ANEXO A - COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS



Universidade
Estadual de Londrina

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

OF. CIRC. CEUA N ° 086/2014

Londrina, 11 de Julho de 2014.

Prezado Pesquisador,

A CEUA/UDEL, reunida em 29 de Abril de 2013, avaliou o pedido de modificação do número de animais referente ao projeto de pesquisa intitulado "**Determinação dos valores de enolase neuronal específica em cães hípidos e com encefalite**", processo CEUA n° 6612.2014.33, pesquisa do Centro de Ciências Agrárias sob sua responsabilidade. Após as explicações estatísticas definindo o n de animais por grupo conforme apresentado no processo CEUA n° 11377.2014.63, o pedido foi julgado como **aprovado** entendendo-se que os princípios éticos postulados pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal estão respeitados.

Serão utilizados 90 cães sem linhagem, idade e peso específicos, machos e fêmeas, provenientes da rotina de atendimento ambulatorial/hospitalar do Setor de Clínica Médica do Hospital Veterinário da UDEL, e do círculo familiar ou de convívio da equipe do projeto (no que se refere à amostragem de animais saudáveis). O projeto tem como objetivo determinar os valores de enolase específica neuronal (NSE) em amostras de sangue de cães saudáveis e com encefalite. No momento do atendimento ambulatorial, se houver suspeita de encefalite, será realizado o exame neurológico padrão e uma vez confirmada a suspeita, será realizada a coleta de sangue. Os animais serão divididos em 2 grupos, sendo um composto por 45 cães com suspeita/confirmação de encefalite e outro composto por 45 cães saudáveis. Nos animais com sinal neurológicos compatíveis com encefalite serão realizados testes complementares para cinomose, toxoplasmose e neosporose. Os protocolos experimentais estão aprovados para execução em 24 meses.

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

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

Prof. Dr. Waldiceu Aparecido Venti Junior
Coordenador da CEUA/UDEL

Ilmo Sr.

Prof. Dr. Lucas Alécio GomesDepartamento de Clínicas Veterinárias
Centro de Ciências Agrárias

Com cópia para Sra. Égle Maria de Sousa (Chefe da DCA/PROPPG), Diretor(a) do Centro de Ciências Agrárias e Diretor (a) do Biotério Central do Hospital Universitário.

3

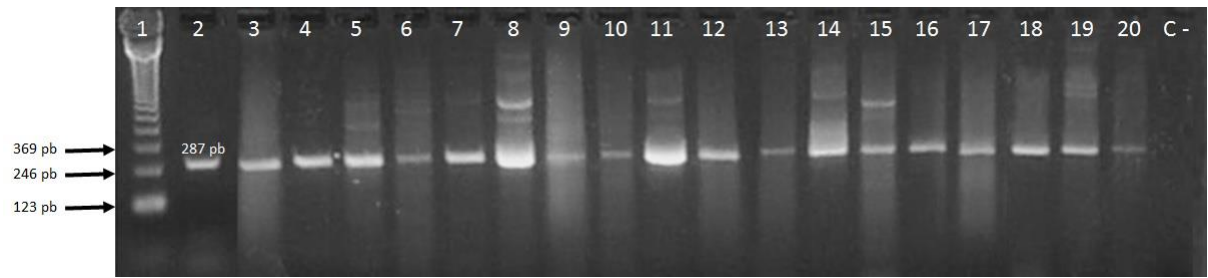
4

- 1 Tabela – Resenhas e exames complementares de 19 cães do grupo sem encefalite (GS),
 2 obtidos no período de julho de 2014 à julho de 2015, na Universidade Estadual de Londrina.

Canino	Resenha	HB	Le	PI	PT	Creat	NSE
1	3 anos, F, Daschund	16,3	6850	180000	7,6	1	8,47
2	4 anos, M, Dalmata	15	9500	410000	7,9	1,2	5,81
3	3 anos, F, Border Collie	10,3	13150	234000	9,9	1,3	4,10
4	5 anos, F, Labrador	13,3	8400	370000	6,8	1,3	4,48
5	1,5 anos, M, Poodle	16	11800	180000	7,5	1,1	24,23
6	3 anos, F, Daschund	14	6600	300000	6,2	1	17,33
7	5 anos, M, SRD	16,6	-	300000	-	0,8	18,40
8	4 anos, F, SRD	12,7	6500	312000	6,9	1	7,46
9	3 anos, F, Labrador	14,7	20350	447000	8,7	1,2	8,53
10	5 anos, M, Red Heler	13	10800	290000	6,6	1	7,39
11	4 anos, M, Bull Terrier	13	11700	525000	7,2	1,1	7,20
12	5 anos, F, Golden Retriever	13,3	16250	200000	6,4	0,9	0,30
13	3 anos, M, Poodle	15,3	9900	129000	-	0,8	5,11
14	2 anos, F, SRD	-	-	-	7,2	0,9	14,92
15	4 anos, M, SRD	11,6	10750	400000	-	-	14,73
16	3 anos, F, Daschund	15	12000	150000	6,9	0,8	14,35
17	3 anos, F, SRD	14,4	7700	450000	7	1	12,90
18	4 anos, F, Sttarfordshire Terrier	14,6	14400	270000	6,5	0,4	9,23
19	2 anos, F, Sttarfordshire Terrier	13	11150	345000	6,9	1,1	13,34
Total							X = 10,44

- 3 HB – Hemoglobina; Le – Leucócitos Totais; Pl – Plaquetas; PT – Proteínas Totais; Creat –
 4 Creatinina; NSE – Enolase neuronal específica

5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17



1
2 Figura: reação de PCR que amplifica um fragmento de 287 pb do gene N de CDV. Canaleta 1: padrão
3 123 pb (Invitrogen™ Life Technologies®, USA). Canaletas 2-12: amostras de urina. Canaletas 13-20:
4 amostras de sangue total. C-: controle negativo utilizando água ultrapura tratada com dietil
5 pirocarbonato (DEPC) (Invitrogen™ Life Technologies®, USA).

6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26

1 **RESUMO EXPANDIDO APRESENTADO NO 42º CONGRESSO BRAS. DE**
2 **MEDICINA VETERINÁRIA E 1º CONGRESSO SUL-BRASILEIRO DA**
3 **ANCLIVEPA - 31/10 A 02/11 DE 2015 - CURITIBA – PR**

4
5
6
7 **VALIDAÇÃO DO KIT 43-NSEHU-E01 ALPCO® PARA DETERMINAÇÃO DA**
8 **ENOLASE NEURONAL ESPECÍFICA EM CÃES SAUDÁVEIS E COM**
9 **ENCEFALITE – RESULTADOS PRELIMINARES**

10
11 **VALIDATION OF THE KIT 43-NSEHU-E01 ALPCO® FOR DETERMINATION OF**
12 **THE NEURONAL SPECIFIC ENOLASE IN HEALTH DOGS AND DOGS WITH**
13 **ENCEPHALITIS – PRELIMINARY RESULTS**

14 ELIAS, BC¹; NAVARRO, IT²; ALFIERI, AF²; GARCIA, J.L²; SARGI,
15 LF³; GOMES, LA⁴

16 1 – Mestrando do Programa de Pós Graduação em Ciência Animal, UEL

17 2 – Departamento de Medicina Veterinária Preventiva , UEL

18 3 – Graduanda de Medicina Veterinária - UEL

19 4 – Departamento de Clínicas Veterinárias, UEL

20
21
22 **RESUMO**

23 A enolase neuronal específica (NSE) é uma enzima encontrada no citoplasma de
24 neurônios, a qual é liberada no líquido e no sangue em situações de injúrias cerebrais, servindo
25 como biomarcador. O objetivo deste trabalho foi validar o kit 43-NSEHU-E01 ALPCO®, e
26 quantificar a NSE sérica de cães saudáveis e com encefalite.

27
28 **PALAVRAS-CHAVES:** neurologia, biomarcadores, cinomose.

29
30 **ABSTRACT**

31 The specific neuronal enolase (NSE) is an enzyme found in the cytoplasm of neurons.
32 In situations, which there is brain injury, this enzyme is released into the cerebrospinal fluid
33 and blood, and can serve as a biomarker. The objective of this study was to validate the kit
34 43-NSEHU-E01 ALPCO®, and quantify serum NSE healthy dogs and dogs with encephalitis.

1
2 **KEY-WORDS:** neurology, biomarkers, distemper.

3
4 **INTRODUÇÃO**

5 A enolase neuronal específica (NSE) é uma enzima glicolítica intracitoplasmática
6 encontrada nos neurônios, composta por duas subunidades gamma (γ) presente em maior
7 quantidade na substância cinzenta. Liberada no líquido cefalorraquidiano (LCR) e no sangue,
8 quando há injúria cerebral. (Zenaide e Gusmao-Flores, 2013; Usui et al., 1994). As encefalites
9 em cães podem ser ocasionadas por vários agentes infecciosos, como vírus, protozoários,
10 bactérias, riquetsias, fungos e príons (Gandini et al, 2010). Assim sendo, o objetivo desse
11 estudo foi validar o kit 43-NSEHU-E01 -ALPCO® por meio da mensuração da NSE sérica em
12 cães saudáveis e com encefalite e determinar se há diferença entre os grupos estudados.

13
14 **MATERIAL E MÉTODOS**

15 Foram utilizados 5 cães saudáveis no grupo controle (GC) e 5 cães com sinais clínicos
16 de encefalite (GE) ocasionados por cinomose. Não houve distinção quanto ao sexo e raça para
17 os cães do GE, entretanto, para o GS foi adotada somente animais adultos. Este trabalho foi
18 aprovado pelo Comissão de Ética em Pesquisa com Animais, com número de ofício 086/14.
19 Os animais saudáveis foram avaliados por meio de anamnese, exame físico e exames
20 laboratoriais, da mesma forma que os cães com encefalite. Os quadros de encefalite foram
21 caracterizados pela detecção de alterações neurológicas observadas mediante o exame
22 neurológico completo e envolvendo a área tálamo-cortical e/ou cerebelar e/ou de tronco
23 encefálico. Realizou-se hemograma de todos os cães com suspeita de cinomose e confirmou-
24 se a doença por meio da técnica de PCR com DNA e RNA extraídos de amostras de sangue e
25 urina. A quantificação da NSE se deu por teste de ELISA utilizando kit intitulado Neuron
26 Specific Enolase ELISA (número de catálogo 43-NSEHU-E01, ALPCO®). O anticorpo para
27 NSE-monoclonal é humano, portanto, para certificar a funcionalidade do teste em cães a
28 identidade da sequência de aminoácido da gamma enolase humana, encontrada no banco de
29 dados do pubmed (NP_001966.1), foi verificada e comparada com sequência de gamma
30 enolase de canideos (XP_003639985.1), utilizando o software BLASTP (Protein Basic Local
31 Alignment Search Tool), versão 2.2.29 + (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), que
32 apresentou 99% de identidade, sustentando o uso do kit humano em cães. A avaliação de NSE
33 foi realizada em duplicata, utilizando a leitora de microplacas em absorbância com filtro de
34 450 nm, seguindo as orientações do laboratório. Os cães com encefalite (GE) foram

1 submetidos a eutanásia por solicitação dos proprietários devido ao agravamento dos sinais
2 clínicos e prognóstico ruim.

4 **RESULTADOS**

5 Em cada um dos grupos haviam 3 (60%) fêmeas e 2 (40%) machos. No exame neurológico os
6 locais de lesão variaram, sendo que em 1 (20 %) cão houve acometimento do prosencéfalo e
7 cerebelo, 2 (40 %) apresentaram lesão no tronco cerebral e medula espinhal, 40%
8 prosencéfalo, medula espinhal e cerebelo.

9 Após a eutanásia, o LCR foi imediatamente coletado via cisterna cerebelo medular, e
10 em 4 (80 %) dos animais com encefalite verificou-se a presença de pleocitose linfocítica com
11 aumento de proteína, e em 1 (20 %) observou-se apenas aumento de proteína. O teste de
12 *Kruskal-Wallis* foi utilizado para analisar a diferença entre as médias, obtendo-se valor de
13 $P=0,016$ que inicialmente fortalece a hipótese de diferença das medias dos valores de NSE
14 entre os grupos.

16 **DISCUSSÃO**

17 Os cães com encefalite apresentaram valores de NSE aumentados quando comparados
18 com o grupo controle. Esse resultado confirma que a lesão encefálica por inflamação libera a
19 NSE no sangue a qual foi detectada com eficácia comprovando que o kit humano utilizado
20 serve para detecção da referida enzima. Esses achados estão de acordo com os de Usui et al
21 (1993) que observaram aumento da NSE sérica e também no LCR em cães submetidos
22 experimentalmente a lesão cerebral isquêmica. Nos seres humanos, as situações clínicas
23 documentadas em que a NSE apresentou aumento devido ao dano neuronal foram as
24 encefalites, o trauma crânio encefálico e a isquemia cerebral por parada cardiorespiratória
25 (Lima et al., 2004), porém, em medicina veterinária há escassez na literatura sobre o referido
26 biomarcador, ressaltando assim a importância de trabalhos envolvendo a NSE. Os testes
27 utilizando biomarcadores séricos para lesão encefálica são vantajosos por serem
28 minimamente invasivos e servir de auxílio para avaliar a eficácia da terapia e fator de
29 prognóstico.

31 **CONCLUSÃO**

32 O kit 43-NSEHU-E01, ALPCO® para humanos foi eficaz na detecção da NSE no soro
33 de cães saudáveis e com encefalite validando o seu uso como ferramenta na detecção de
34 lesões neuronais precoces na espécie estudada.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25

REFERÊNCIAS

- GANDINI, A; JAGGY, A; CHALLANDE-KATHMANN, I. et al. Cerebrum. In: JAGGY, A. (Org.). **Small Animal Neurology An Illustrated Text**. Hannover: Schlütersche Verlagsgesellschaft mbH & Co. KG, Hans-Böckler-Allee, 2010, Cap.18, p.427-466.
- LIMA J.E.; TAKAYANAGUI O.M.; GARCIA L.V. et al. Use of neuron-specific enolase for assessing the severity and outcome in patients with neurological disorders. **Brazilian Journal of Medical and biological Research**, v.37, n.1, p. 19-26, 2004.
- USUI A.; KATO K.; MURASE M. et al. Neural tissue-related proteins (NSE, G0a, 28-kDa calbindin-D, S100b and CK-BB) in serum and cerebrospinal fluid after cardiac arrest. **Journal of Neurological Sciences**, v.23, n.1, p.134-139, 1994.
- ZENAIDE P, GUSMAO-FLORES D. Biomarcadores na encefalopatia séptica: revisão sistemática dos estudos clínicos. **Revista Brasileira de Terapia Intensiva**, v.25, n.1, p. 56-62, 2013.



Neuron Specific Enolase ELISA

For the quantitative determination of human neuron specific enolase levels in serum.

Please read carefully due to Critical Changes, e.g., Preparation and Storage.

For Research Use Only. Not For Use In Diagnostic Procedures.

Catalog Number:	43-NSEHU-E01
Size:	96 wells
Version:	4/US/2013-02- ALPCO August 08, 2013

26G Keewaydin Drive • Salem, NH 03079

Phone: (800) 592-5726 • Fax: (603) 898-6854

www.alpco.com • Email: ts@alpco.com

1
2
3
4
5
6

1 INTENDED USE

2 This ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) kit is intended for the quantitative
3 determination of human neuron specific enolase (NSE) levels in serum samples. The test
4 might be used as an aid in researching neuroendocrine differentiated tumors such as small
5 cell lung cancer and neuroblastoma, melanoma, seminoma; and with injury of the central
6 nervous system such as traumatic brain injury (TBI).

8 SUMMARY OF PHYSIOLOGY

9 The glycolytic enzyme enolase (2-phospho-D-glycerate hydrolyase) exists as several dimeric
10 isoenzymes ($\alpha\alpha$, $\alpha\beta$, $\beta\beta$ and $\gamma\gamma$) composed of three distinct subunits: α , β , and γ . Three
11 isoenzymes are found in human brain: $\alpha\alpha$, $\alpha\beta$, and $\gamma\gamma$. The heterologous $\alpha\gamma$ -isoenzyme and the
12 homologous $\gamma\gamma$ -enolase isoenzymes are known as neuron-specific enolase (NSE) as these
13 isoenzymes initially were detected in neurons and neuroendocrine cells. Using monoclonal
14 antibodies specific to the γ -subunit of the enzyme allows the test to detect both the $\alpha\gamma$ and the
15 $\gamma\gamma$ forms.

16 The NSE levels are quite low in normal healthy people and in people with benign disease.
17 Lung cancer is one of the most common cancer forms with an incidence of ~50-100 per
18 100,000 population. Approximately 20% of the lung cancer is small cell lung cancer. NSE has
19 been shown to be a valuable tumor marker of neuroendocrine origin, particularly in small cell
20 lung cancer and in neuroblastoma. Although NSE is similar to Chromogranin A in detecting
21 small cell lung cancer and neuroblastoma, Chromogranin A seems better in detecting
22 carcinoid.

24 ASSAY PRINCIPLE

25 This ELISA is designed, developed, and produced for the quantitative measurement of human
26 NSE in serum samples. The assay utilizes the two-site “sandwich” technique with two
27 selected monoclonal antibodies that bind to different epitopes of the γ -subunit of the enzyme.
28 Assay standards, controls, and samples are added directly to microplate wells that are coated
29 with streptavidin. Subsequently, a mixture of a biotinylated NSE specific monoclonal
30 antibody and a horseradish peroxidase (HRP) labeled NSE specific monoclonal antibody is
31 added to each microplate well. After the first incubation a “sandwich” immunocomplex of
32 “streptavidin-biotin-monoclonal antibody-human NSE-monoclonal antibody-HRP” is formed.
33 The unbound monoclonal antibodies are removed in the subsequent washing step. For the
34 detection of this immunocomplex, the wells are then incubated with a substrate solution in a
35 timed reaction and then measured in a spectrophotometric microplate reader. The enzymatic
36 activity of the immunocomplex bound to the NSE on the wall of the microplate well is
37 directly proportional to the amount of NSE in the sample. A standard curve is generated by
38 plotting the absorbance versus the respective human NSE concentration for each standard on
39 point-to-point, cubical scales, or 4 parameter curve fit. The concentration of human NSE in
40 test samples is determined directly from this standard curve.

42 REAGENTS: Preparation and Storage

43 This test kit must be stored at 2 – 8°C upon receipt. For the expiration date of the kit refer to
44 the label on the kit box. All components are stable until this expiration date.

46 **Prior to use allow all reagents to come to room temperature.** Regents from different kit lot
47 numbers should not be combined or interchanged.

49 1. Streptavidin Coated Microplate (Cat. No. 10040)

1 One microplate with 12 x 8 strips (96 wells total) coated with streptavidin. The plate is
2 framed and sealed in a foil zipper bag with a desiccant. This reagent should be stored at 2
3 – 8°C and is stable until the expiration date on the kit box.
4

5 **2. NSE Tracer Antibody (Cat. No. 30239)**

6 One vial containing 0.6 ml HRP labeled anti-human NSE specific monoclonal antibody in
7 a stabilized protein matrix. This reagent must be diluted with NSE Capture Antibody
8 before use. The dilution procedure is in the assay procedure section. This reagent should
9 be stored at 2 – 8°C and is stable until the expiration date on the kit box.
10

11 **3. NSE Capture Antibody (Cat. No. 30238)**

12 One vial containing 12 ml of biotinylated NSE capture antibody. It should be only used
13 after mixing with NSE tracer antibody. The reagent should be stored at 2 – 8°C and is
14 stable until the expiration date on the kit box.
15

16 **4. Wash Concentrate (Cat. No. 10010)** One bottle contains 30 ml of 30 fold concentrate.
17 Before use the contents must be diluted with 870 ml of demineralized water and mixed well.
18 Upon dilution this yields a working wash solution containing a surfactant in phosphate
19 buffered saline with a non-azide, non-mercury based preservative. The diluted wash buffer
20 should be stored at room temperature and is stable until the expiration date on the kit box.
21

22 **5. HRP Substrate (Cat. No. 10020)** One bottle contains 12 ml of tetramethylbenzidine
23 (TMB) with stabilized hydrogen peroxide. This reagent should be stored at 2 – 8°C and is
24 stable until the expiration date on the kit box.
25

26 **6. Stop Solution (Cat. No. 10030)** One bottle contains 12 ml of 0.5 M sulfuric acid. This
27 reagent should be stored at 2 – 8°C or room temperature and is stable until the expiration date
28 on the kit box.
29

30 **7. NSE Standards (Cat. No. 30231 – 30235)** Two sets of five vials each containing human
31 NSE in a lyophilized bovine serum based matrix with a non-azide, non-mercury based
32 preservative. **Refer to vial for exact concentration for each standard.** These reagents
33 should be stored at 2 – 8°C and are stable until the expiration date on the kit box.
34

35 **8. NSE Controls (Cat. No. 30236 – 30237)** Two sets of two vials each containing human
36 NSE in a lyophilized bovine serum based matrix with a non-azide, non-mercury based
37 preservative. **Refer to vials for exact concentration range for each control.** Both controls
38 should be stored at 2 – 8°C and are stable until the expiration date on the kit box.
39

40 **SAFETY PRECAUTIONS** The reagents must be used in a professional laboratory
41 environment and are for research use only. Source material of bovine serum was derived in
42 the contiguous 48 United States. It was obtained only from healthy donor animals maintained
43 under veterinary supervision and found free of contagious diseases. Wear gloves while
44 performing this assay and handle these reagents as if they are potentially infectious. Avoid
45 contact with reagents containing TMB, hydrogen peroxide, or sulfuric acid. TMB may cause
46 irritation to skin and mucous membranes and cause an allergic skin reaction. TMB is a
47 suspected carcinogen. Sulfuric acid may cause severe irritation upon contact with skin. Do not
48 get in eyes, on skin, or on clothing. Do not ingest or inhale fumes. On contact, flush with
49 copious amounts of water for at least 15 minutes. Use Good Laboratory Practices.

1 **MATERIALS REQUIRED BUT NOT PROVIDED** 1. Precision single channel pipettes
2 capable of delivering 10 µl, 50 µl, 100 µl, 1000 µl, etc. 2. Repeating dispenser suitable for
3 delivering 100 µl. 3. Disposable pipette tips suitable for above volume dispensing. 4.
4 Disposable 12 x 75 mm or 13 x 100 glass or plastic tubes. 5. Disposable plastic 100 ml and
5 1,000 ml bottle with caps. 6. Aluminum foil. 7. Deionized or distilled water. 8. Plastic
6 microplate well cover or polyethylene film. 9. ELISA multichannel wash bottle or automatic
7 (semi-automatic) washing system. 10. Spectrophotometric microplate reader capable of
8 reading absorbance at 450 nm.

9
10 **SPECIMEN COLLECTION** Only 20 µl of human serum is required for human NSE
11 measurement in duplicate. No special preparation of the individual is necessary prior to
12 specimen collection. Whole blood should be collected by venipuncture and must be allowed
13 to clot for a minimum of 30 minutes at room temperature before the serum is separated by
14 centrifugation (850-1500 x g for 10 minutes). The serum should be separated from the clot
15 within two hours of blood collection and transferred to a clean test tube. Serum samples
16 should be stored at 2 - 8°C if the assay is to be performed within 24 hours. Otherwise, samples
17 should be stored at -20°C or below until measurement. Avoid any repeated freezing and
18 thawing of the sample.

19
20 **Plasma samples are not recommended for NSE measurement.**

21 **ASSAY PROCEDURE**

22 **1. Reagent Preparation**

- 23 (1) Prior to use allow all reagents to come to room temperature. Reagents from different kit
24 lot numbers should not be combined or interchanged.
25 (2) Wash Concentrate must be diluted to working strength solution prior to use. Please see
26 REAGENTS section for details.
27 (3) Reconstitute all assay standards and controls by adding **0.5 ml** of demineralized water
28 to each vial. Allow the standards and controls to sit undisturbed for 10 minutes, and
29 then mix well by inversions or gentle vortexing. One must make sure that all solids are
30 dissolved completely prior to use. **These reconstituted standards and controls**
31 **should be stored at 2-8°C for up to 30 days.** It is not recommended to freeze the
32 reconstituted standards and controls.
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50

1 **3. Assay Procedure**

- 2 (1) Place a sufficient number of streptavidin coated microwell strips in a holder to run
 3 human NSE standards, controls, and unknown samples in duplicate.
 4 (2) Test Configuration
 5

ROW	STRIP 1	STRIP 2	STRIP 3
A	STD 1	STD 5	SAMPLE 2
B	STD 1	STD 5	SAMPLE 2
C	STD 2	C 1	SAMPLE 3
D	STD 2	C 1	SAMPLE 3
E	STD 3	C 2	SAMPLE 4
F	STD 3	C 2	SAMPLE 4
G	STD 4	SAMPLE 1	
H	STD 4	SAMPLE 1	

- 6
 7
 8 (3) Prepare NSE Tracer Antibody and Capture Antibody working solution by 1:21 fold
 9 dilution of the Tracer Antibody (30239) with the biotinylated Capture Antibody
 10 (30238). For each strip, mix 1 ml of the Capture Antibody with 50 μ l of the Tracer
 11 Antibody in a clean test tube.
 12 (4) Add **10 μ l** of standards, controls, and samples into the designated microwells.
 13 (5) Add **100 μ l** of above mixture of Tracer Antibody and Capture Antibody solution to
 14 each of the wells.
 15 (6) Cover the plate with the plate sealer and incubate plate at room temperature, shaking at
 16 170 rpm for **1 hour**.
 17 (7) Remove plate sealer. Aspirate the contents of each well. Wash each well 5 times by
 18 dispensing 350 μ l of working wash solution into each well and then completely
 19 aspirating the contents. Alternatively, an automated microplate washer can be used.
 20 (8) Add **100 μ l** of HRP Substrate into each of the wells.
 21 (9) Cover the plate with one plate sealer and also with aluminum foil to avoid exposure to
 22 light.
 23 (10) Incubate plate at room temperature for **10 minutes or less**.
 24 (11) Remove the aluminum foil and plate sealer. Add **100 μ l** of Stop Solution into each of
 25 the wells. Mix gently.
 26 (12) Read the absorbance at 450 nm within 10 minutes in a microplate reader.
 27 *NOTE: to reduce the background, one can set the instrument to dual wavelength*
 28 *measurement at 450 nm with background wavelength correction set at 595 nm or 620*
 29 *nm or 630 nm.*
 30

31 **PROCEDURAL NOTES**

- 32 1. It is recommended that all standards, controls, and unknown samples be assayed in
 33 duplicate. The average absorbance reading of each duplicate should be used for data
 34 reduction and the calculation of results.
 35 2. Keep light sensitive reagents in the original amber bottles.
 36 3. Store any unused streptavidin coated strips in the foil zipper bag with desiccant to
 37 protect from moisture.
 38 4. Careful technique and use of properly calibrated pipetting devices are necessary to
 39 ensure reproducibility of the test.

- 1 5. Incubation times or temperatures other than those stated in this insert may affect the
- 2 results.
- 3 6. Avoid air bubbles in the microwell as this could result in lower binding efficiency and
- 4 higher CV% of duplicate reading
- 5 7. All reagents should be mixed gently and thoroughly prior to use. Avoid foaming.

7 INTERPRETATION OF RESULTS

- 8 1. Calculate the average absorbance for each pair of duplicate test results.
- 9 2. Subtract the average absorbance of the STD 1 (0 ng/ml) from the average absorbance of
- 10 all other readings to obtain the corrected absorbance.
- 11 3. The standard curve is generated by the corrected absorbance of all standard levels on
- 12 the ordinate against the standard concentration on the abscissa using point-to-point or
- 13 log-log paper. Appropriate computer assisted data reduction programs may also be
- 14 used for the calculation of results. We recommend using **Point-to-Point** curve fit.

15
16 The human NSE concentrations for the controls and samples are read directly from the
17 standard curve using their respective corrected absorbance.

19 EXAMPLE DATA AND STANDARD CURVE

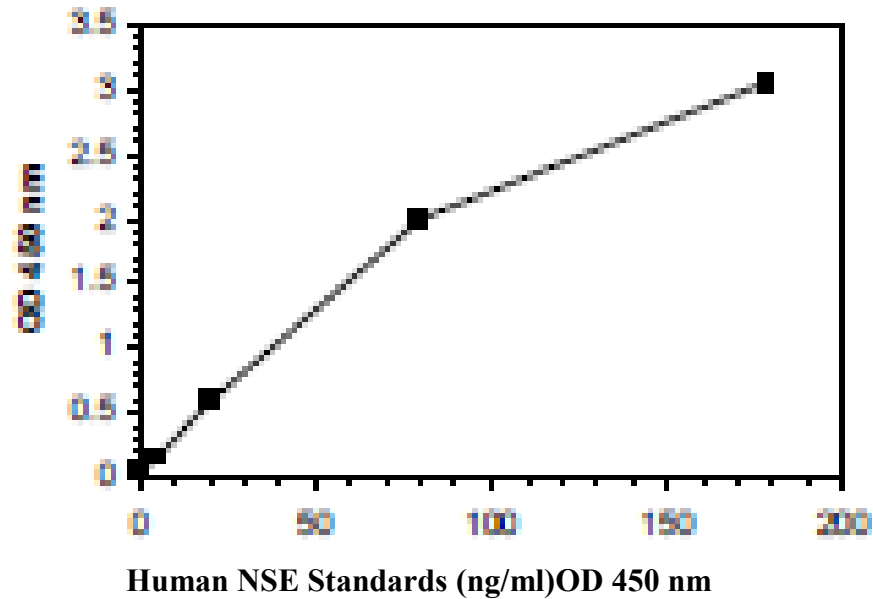
20 A typical absorbance data and the resulting standard curve from human NSE ELISA are
21 represented. This curve should not be used in lieu of a standard curve run with each assay.
22

Sample	OD 460 nm Absorbance			Results ng/ml
	Readings	Average	Corrected	
0 ng/ml	0.042 0.043	0.043	0.000	
5 ng/ml	0.170 0.162	0.166	0.123	
20 ng/ml	0.597 0.587	0.592	0.549	
80 ng/ml	2.068 1.899	1.979	1.936	
178 ng/ml	3.040 3.040	3.040	2.997	
Control 1	0.369 0.368	0.359	0.316	11.27 ng/ml
Control 2	2.803 2.914	2.859	2.816	147.24 ng/ml

23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33

1

Human NSE ELISA



2

3

4

5

6

7

8

9

10

11

EXPECTED VALUES

12

One hundred seventy two normal adult sera were measured with this human NSE ELISA. The normal range was found to be less than 15 ng/ml. It is highly recommend that each laboratory should establish its own normal cut-off level.

15

16

Although a serum NSE level above 15 ng/ml would be an aid in research, it is recommended to establish a baseline level of NSE for each individual for monitoring individuals with cancer after surgery. A clear surge of NSE level would indicate an increase in cancer cell activity.

19

20

LIMITATION OF THE PROCEDURE

21

1. Since there is no Gold Standard concentration available for human NSE measurement, the values of assay standards were established by correlation to a highly purified NSE standard.
2. When sample values read higher than the highest standard, it is recommend to dilute the samples and assay again.
3. Bacterial or fungal contamination of serum specimens or reagents, or cross contamination between reagents, may cause erroneous results.
4. Water deionized with polyester resins may inactive the horseradish peroxidase enzyme.

28

29

30

QUALITY CONTROL

31

To assure the validity of the results each assay should include adequate controls with known NSE levels. We recommend that all assays include the laboratory's own or commercial NSE controls in addition to those provided with this kit.

34

35

PERFORMANCE CHARACTERISTICS

1 **Sensitivity**

2 The sensitivity of the human NSE ELISA as determined by the 95% confidence limit on 20
3 duplicate determinations of zero standard is approximately 1.2 ng/ml.

4
5 **High Dose “hook” effect**

6 This assay has showed that it does not have any high dose “hook” effect up to 20,000 ng/ml.

7
8 **Precision**

9 The intra-assay precision is validated by measuring two controls samples in a single assay
10 with 20 replicate determinations.

Mean NSE Value (ng/ml)	CV (%)
11.24	4.0
132.16	3.5

12
13 The inter-assay precision is validated by measuring two control samples in duplicate in 12
14 individual assays.

Mean NSE Value (ng/ml)	CV (%)
11.37	5.99
144.98	4.85

15
16
17
18
19 **Linearity**

20 Two human serum samples were diluted with assay buffer and assayed. The results in the
21 value of ng/ml are as follows:

#	Dilution	Observed Value	Expected Value	Recovery %
1	Neat	178	-	-
	1:2	85.47	89	96
	1:4	45.38	44.5	102
	1:8	22.40	22.25	101
2	Neat	146	-	-
	1:2	71.44	73	98
	1:4	34.82	36.5	95

22
23
24 **Recovery**

25 Two serum samples were spiked with various amounts of human NSE (1 vol. + 1 vol. mixture) and
26 assayed. The results in the value of ng/ml are as follows:

27

#	Sample	Spiked Sample	Observed Value	Expected Value	Recovery %
1	Sample 1	Sample 3	10.32	10.14	102
		Sample 4	20.78	21.68	96
2	Sample 2	Sample 3	10.07	10.23	98
		Sample 4	23.88	20.35	117

1
2
3
4 **REFERENCES**

5 1. Pinson P, Joos G, Watripont P, Brusselle G, Pauwels R. Serum neuron-specific enolase as a
6 tumor marker in the diagnosis and follow-up of small-cell lung cancer. *Respiration*. 1997;
7 64(1):102-7.

8
9 2. Burghuber OC, Worofka B, Schernthaner G, Vetter N, Neumann M, Dudczak R, Kuzmits
10 R. Serum neuron-specific enolase is a useful tumor marker for small cell lung cancer. *Cancer*.
11 1990 Mar 15; 65(6):1386-90.

12
13 3. Ebert W, Muley T, Trainer C, Dienemann H, Drings P. Comparison of changes in the NSE
14 levels with clinical assessment in the therapy monitoring of patients with SCLC. *Anticancer*
15 *Res*. 2002 Mar-Apr; 22(2B):1083-9.

16
17 4. Bonner JA, Sloan JA, Rowland KM Jr, Klee GG, Kugler JW, Mailliard JA, Wiesenfeld M,
18 Krook JE, Maksymiuk AW, Shaw EG, Marks RS, Perez EA. Significance of neuron-specific
19 enolase levels before and during therapy for small cell lung cancer. *Clin Cancer Res*. 2000
20 Feb; 6(2):597-601.

21
22 5. Jørgensen LG, Osterlind K, Hansen HH, Cooper EH. Serum neuron-specific enolase (S-
23 NSE) in progressive small-cell lung cancer (SCLC). *Br J Cancer*. 1994 Oct; 70(4):759-61.

24
25 6. Nitta T, Fukuoka M, Masuda N, Kusunoki Y, Matsui K, Kudoh S, Hirashima T, Yana T,
26 Ito K, Takada M. Significance of serum neuron-specific enolase as a predictor of relapse of
27 small cell lung cancer. *Jpn J Clin Oncol*. 1995 Oct; 25(5):179-83.

28
29 7. Pahlman S., Esscher T., Bergvall P. And Odelstad L. Purification and characterization of
30 human neuron-specific enolase: radioimmunoassay development. *Tumor Biol*. 1984; 5,127-
31 139.

32
33 **Short Assay Procedure:**

- 34
35 1. Add 10 µl of standards, controls, and serum samples into the designated microwell.
36 2. Add 100 µl of the tracer/capture antibody mixture to each well.

- 1 3. Cover with a plate sealer and incubate the plate at room temperature, shaking at 170 rpm
- 2 for 1 hour.
- 3 4. Wash each well 5 times.
- 4 5. Add 100 μ l of HRP Substrate to each of the wells.
- 5 6. Cover with a plate sealer and aluminum foil and incubate plate at room temperature for
- 6 10 minutes or less.
- 7 7. Add 100 μ l of Stop Solution to each of the wells.
- 8 8. Read the absorbance at 450 nm within 10 minutes.
- 9