



UNIVERSIDADE TÉCNICA DE LISBOA
Faculdade de Medicina Veterinária

A IMPORTÂNCIA CLÍNICA DA ANÁLISE DO LÍQUIDO CEFALORRAQUIDIANO
PARA O DIAGNÓSTICO DE AFEÇÕES DO SISTEMA NERVOSO CENTRAL DO
CÃO

FELIPE FERNANDES DE ALMEIDA

CONTITUIÇÃO DO JÚRI

Doutor António Jose de Almeida
Ferreira

Doutor José Henrique Duarte Correia

Doutora Graça Maria Alexandre Pires
de Lopes de Melo

Dr. João Carlos Gil da Silva Ribeiro

ORIENTADOR

Dr. João Carlos Gil da Silva
Ribeiro

CO-ORIENTADOR

Doutora Graça Maria Alexandre
Pires de Lopes de Melo

2013

LISBOA



UNIVERSIDADE TÉCNICA DE LISBOA
Faculdade de Medicina Veterinária

A IMPORTÂNCIA CLÍNICA DA ANÁLISE DO LÍQUIDO CEFALORRAQUIDIANO
PARA O DIAGNÓSTICO DE AFEÇÕES DO SISTEMA NERVOSO CENTRAL DO
CÃO

FELIPE FERNANDES DE ALMEIDA

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA VETERINÁRIA

CONTITUIÇÃO DO JÚRI

Doutor António José de Almeida
Ferreira

Doutor José Henrique Duarte Correia

Doutora Graça Maria Alexandre Pires
de Lopes de Melo

Dr. João Carlos Gil da Silva Ribeiro

ORIENTADOR

Dr. João Carlos Gil da Silva
Ribeiro

CO-ORIENTADOR

Doutora Graça Maria Alexandre
Pires de Lopes de Melo

2013

LISBOA

Agradecimentos

“Do not spoil what you have by desiring what you have not; remember that what you now have was once among the things you only hoped for.”
— Epicurus

É imprescindível agradecer a todos os que me ajudaram ao longo dos anos que antecederam a escrita desta dissertação...

Conhecidos, colegas, amigos e familiares...

Conhecidos que se tornam colegas...

Colegas que se tornam amigos...

Mas acima de tudo, aos amigos que se tornam família!

A IMPORTÂNCIA CLÍNICA DA ANÁLISE DO LÍQUIDO CEFALORRAQUIDIANO PARA O DIAGNÓSTICOS DE AFEÇÕES DO SISTEMA NERVOSO CENTRAL DO CÃO

Resumo

O diagnóstico definitivo e o prognóstico de afecções neurológicas é essencial para a realização de uma terapêutica adequada e eficaz. Contudo, a disponibilidade dos meios complementares de diagnóstico (MCD), os riscos associados e a relação custo-benefício tornam a seleção dos meios de diagnóstico que conduzem a este último verdadeiramente um desafio.

O líquido cefalorraquidiano (LCR) é o produto tecidual do sistema nervoso central (SNC) mais facilmente acessível e é passível de sofrer modificações aquando de afecções que alterem as barreiras hemato-encefálicas e sangue-LCR.

Esta dissertação tem como objectivo determinar a importância da análise do LCR para o diagnóstico de afecções do SNC do cão. Avaliando o impacto que a análise do LCR tem no número dos MCD realizados por doente, estudou-se uma população de 143 cães com afecções neurológicas. A população foi dividida em dois grupos: grupo "LCR" (n=37), onde se colheu LCR, realizando-se a contagem total de células, o citodiagnóstico e o teste de Pandy, e o grupo "S/LCR" (n=106) onde esses procedimentos não foram realizados.

Estudou-se estatisticamente a relação entre grupos, o número de doentes com e sem diagnóstico definitivo. Verificou-se que a significância dos testes estatísticos entre as variáveis númeroMCD, pesoMCD e LCR são ambas zero (inferiores a 0,05), evidenciando uma relação estatística entre as variáveis. Com análise das médias de exames realizados por animal e o custo-benefício/risco associado a todos os MCD a que esses doentes foram submetidos concluiu-se que a análise de LCR, *per si*, não diminui o número de MCD necessários por animal, sendo sempre essencial recorrer-se a técnicas imagiológicas para determinar o diagnóstico definitivo.

Contudo, verificou-se uma relação positiva no teste de chi-quadrado no que concerne à existência ou não de diagnóstico definitivo e à realização de análises no LCR na presença de neuropatias ($p = 0,020$; $p \leq 0,05$). Assim, a análise do LCR, embora inconclusiva se utilizada de forma isolada, é uma ferramenta útil para a exclusão de etiologias da lista de diagnósticos, ajudando os médicos veterinários a direccionar o seu raciocínio diagnóstico de modo a exercerem uma prática clínica sólida, direccionada e razoável.

Palavras-chave: Líquido cefalorraquidiano, neuropatias, citodiagnóstico, meios complementares de diagnóstico.

CLINICAL IMPORTANCE OF CSF ANALYSIS IN THE DIAGNOSIS OF CANINE CENTRAL NERVOUS SYSTEM DISORDERS

Abstract

In order to implement an adequate and effective treatment for a neuropathy it's crucial to determine the definite diagnosis and prognosis. Notwithstanding, ascertaining a diagnosis can be challenging due to lack of availability of methods of diagnosis, associated risks and cost-benefit ratio.

The cerebrospinal fluid (CSF) is an accessible secretion, which may suffer alterations in its normal characteristics in the presence of a pathologic process that damages the blood-brain and blood-CSF barriers.

This dissertation aims to determine the importance of CSF analysis towards the diagnosis of canine neuropathies. 143 dogs with neurologic disorders were examined in order to assess if the CSF analysis influences the number and type of other methods of diagnosis required per patient. The study population was divided into two different groups: the "CSF" (LCR in portuguese) group (n=37) in which there were obtained and analyzed CSF samples, performing the total cell count, differential cell count and Pandy test; and the W/O-CSF group (S/LCR in portuguese) in which none of those procedures were done.

The inter-relations between groups, the number of diseased dogs, with and without diagnosis were statistically evaluated. The significance of both tests was zero (< 0.05) meaning that there is a statistical relation between the variables. The analysis of the mean of exams performed per patient and their cost-benefit ratio lead to the conclusion that the CSF analysis doesn't decrease the number of methods of diagnosis performed per patient and ergo the imaging tests are crucial to an accurate diagnosis. However, the chi-square test concerning the existence or not of a diagnosis and the CSF implied a significant relationship between both variables ($p = 0.020$; $p < 0.05$). Thus, the CSF analysis, regardless of being inconclusive, is a very helpful mean of diagnosis, helping clinicians to exclude etiologies from their diagnosis' list, to target their clinical reasoning and to make their practice as steadfast and accurate as possible.

Key words: Cerebrospinal fluid, neuropathy, cytologic diagnosis; methods of diagnosis.

Índice

Parte I - Descrição das actividades desenvolvidas durante o estágio.....	1
Parte II - Revisão bibliográfica	1
A. Objectivos.....	1
B. Introdução	2
C. Revisão bibliográfica.....	2
1. Anatomohistologia.....	2
1.1 - LCR - o início.....	2
1.2 - Introdução histórica.....	2
2 - O desenvolvimento embrionário do Sistema Ventricular Cerebral	3
3 - Neurohistologia	5
3.1 - A BHE e a BSLCR	6
4 - Produção do LCR	7
5 - Fluxo	9
6 - Absorção.....	9
7 - O LCR e as suas funções	10
8 - Colheita de LCR.....	11
8.1 - Indicações para colheita.....	12
8.2 - Técnica de colheita.....	12
8.2.1 - Generalidades	12
8.2.2 - Cisterna cerebelomedular (atlanto-occipital)	13
8.2.3 - Cisterna lombar.....	15
8.4 - Contra indicações	16
8.5 - Consequências/complicações	16
9 - O LCR no animal saudável - características e técnicas laboratoriais	17
9.1 - Avaliação física e macroscópica	17
9.1.1 - Coloração.....	17
9.1.2 - Turvação.....	17
9.2 - Análises qualitativas	18
9.2.1 - Proteína total	18
9.3 - Contagem de células.....	19
9.3.1 - Contagem total de células (CTC)	19
9.3.2 - Contagem diferencial de leucócitos (CDLs) e Citodiagnóstico (CDx).....	20
10 - Processamento da amostra	22
11 - O LCR no animal doente - características e técnicas laboratoriais.....	23
11.1 - Avaliação física e macroscópica	23
11.1.1 - Coloração.....	24
11.1.2 - Turvação	25
11.1.3 - Coagulação	25
11.2 - Análises qualitativas	25
11.2.1 - Proteína.....	25
11.2.1.1 - Proteína total.....	26
11.2.1.1.1 - Dissociação albuminocitológica.....	27
11.2.1.2 - Albumina e Quociente de albumina	27
11.2.1.3 - Enzimas.....	27
11.2.1.4 - Globulinas e Imunoglobulinas.....	28
11.2.1.4.1 - Perfis electroforéticos da proteína no LCR	28
11.2.1.4.2 - IgG.....	29
11.2.1.4.3 - IgM.....	29
11.2.1.4.4 - IgA.....	29
11.2.2 - Glicose.....	30
11.3 - Contagem de células.....	30
11.3.1 - CTC.....	30
11.3.2 - CDLs e CDx	31
11.3.2.1 - Pleocitose mononuclear.....	31

11.3.2.1.1 - Linfócitos.....	31
11.3.2.1.2 - Células monocitóides.....	32
11.3.2.2 - Pleocitose neutrofilica.....	33
11.3.2.3 - Pleocitose mista.....	33
11.3.2.4 - Pleocitose eosinoflica.....	34
11.3.2.5 - Outras alterações.....	34
11.4 - Culturas de microorganismos.....	35
11.5 - Técnicas moleculares.....	36
Parte III - Parte prática/Componente experimental.....	38
1 - Material e Métodos.....	38
1.1 - Material de estudo.....	38
1.2 - Material.....	38
1.2.1 - Colheita e análise de LCR.....	38
1.2.2 - Análise estatística.....	39
1.3 - Métodos.....	40
1.3.1 - Colheita e análise de LCR.....	40
1.3.2 - Tratamento estatístico.....	41
2 - Resultados.....	42
2.1 - Estatística descritiva.....	42
2.2 - Estatística comparada.....	47
2.3 - Alterações do LCR e as suas respectivas classes.....	49
3 - Discussão.....	52
3.1 - Estatística descritiva.....	52
3.2 - Estatística comparada.....	55
3.3 - Alterações do LCR e as suas respectivas classes.....	58
4 - Conclusão.....	61
Bibliografia.....	62
Lista de Anexos.....	79
Anexo 1 - Breve descrição das actividades realizadas durante o estágio curricular e casuística.....	80
1 - Actividades desenvolvidas no estágio.....	80
2 - Casuística.....	82
2.1 - Neurolocalização.....	82
2.2 - VITAMIN D.....	83
2.3 - Grau de Lesão.....	83
Anexo 2 - Breve descrição das actividades realizadas durante os estágios adicionais e outras actividades.....	85
1 - Tierspital da Vetsuisse-Fakultät, Universität Bern, Schweiz.....	85
2 - Pathology Department - University of Liverpool, UK.....	86
3 - Outras actividades.....	87
Anexo 3 - Tabela-resumo das características fisiológicas do LCR.....	88
Anexo 4 - Gatos e os achados no LCR.....	89
Anexo 5 - Testes de normalidade de distribuição de valores das variáveis NúmeroMCD e PesoMCD. Tabelas originais obtidas pelo IBM®SPSS®Statistics version 20.....	90
a) NúmeroMCD.....	90
b) PesoMCD.....	92
Anexo 6 - Teste de Mann-Whitney U para as variáveis NúmeroMCD-LCR e PesoMCD-LCR. Tabelas originais obtidas pelo IBM®SPSS®Statistics version 20.....	94
a) NúmeroMCD e LCR.....	94
b) PesoMCD e LCR.....	94
Anexo 7 - Teste de Chi-quadrado entre as variáveis LCR e DX. Tabelas originais obtidas pelo IBM®SPSS®Statistics version 20.....	95

Índice de Figuras

Figura 1 - Estrutura celular das meninges (Adaptado de: De Lahunta & Glass, 2009).	3
Figura 3 - Representação esquemática das BHE e BSLCR presentes no SNC	7
Figura 4 - Referências anatómicas para a colheita de LCR na cisterna atlanto-occipital.....	14
Figura 5 - Perfis electroforéticos proteicos no LCR.....	28
Figura 6 - Hemacitômetro (câmara de Neubauer) e representação esquemática de uma das zonas de contagens de células da câmara (Figura original).	41

Índice de Tabelas

Tabela 1 - Vesículas cerebrais primárias, suas respectivas subdivisões cerebrais e ventrículos associados.....	3
Tabela 2 - Relação entre os segmentos espinhais lombossagrados e as vértebras no cão adulto	15
Tabela 3 - Estimativa da [PT] do LCR através da utilização de <i>urinary dipsticks</i> (N-Multitix SG, Bayer, Miles, Diagnostic Division).	19
Tabela 4 - Colorações do LCR e sua etiologia	25
Tabela 5 - Diferentes diagnósticos diferenciais baseados na contagem total de células de amostras de líquido cefalorraquidiano	30
Tabela 6 - Diagnósticos diferenciais de possíveis afecções do sistema nervoso central tendo em consideração as contagens celulares do líquido cefalorraquidiano.....	35
Tabela 7 - Testes de doenças infecciosas no líquido cefalorraquidiano	37
Tabela 8 - Meios complementares de diagnóstico e seus respectivos pesos.	40
Tabela 9 - Estatística descritiva da variável idade em anos.....	42
Tabela 10 - Frequências absolutas do número de meios complementares de diagnóstico realizados nos diferentes grupos (LCR e S/LCR).	47
Tabela 11 - Frequências absolutas do peso dos meios complementares de diagnóstico realizados nos diferentes grupos (LCR e S/LCR).	47
Tabela 12 - Teste de normalidade de Kolmogorov–Smirnov para a variável número de meios complementares de diagnóstico realizados.....	47
Tabela 13 - Teste de normalidade de Kolmogorov–Smirnov para a variável peso dos meios complementares de diagnóstico realizados.	48
Tabela 14 - Médias do número de meios complementares de diagnósticos realizados nos grupos "LCR" e "S/LCR", tendo em conta a existência ou não de diagnóstico definitivo.....	48
Tabela 15 - Testes não paramétricos para variáveis independentes (NúmeroMCD e LCR), com especial destaque para o teste de Mann-Whitney U e a Significância assintótica a negrito.	48
Tabela 16 - Médias do peso de meios complementares de diagnósticos realizados nos grupos "LCR" e "S/LCR", tendo em conta a existência ou não de diagnóstico definitivo.....	48
Tabela 17 - Testes não paramétricos para variáveis independentes (PesoMCD e LCR), com especial destaque para o teste de Mann-Whitney U e a Significância assintótica a negrito.	49
Tabela 18 - Teste de Chi-quadrado para as variáveis LCR e Dx numa tabela de dupla entrada (2x2) e 1 grau de liberdade.....	49
Tabela 19 - Resultados da análise dos LCR do caso referente à classe "Vascular".	49
Tabela 20 - Resultados da análise dos LCR dos casos referentes à classe "Inflamatório".....	50

Tabela 21 - Resultados clínicos da análise dos LCR do caso referente à classe "Anomalias".....	50
Tabela 22 - Resultados da análise dos LCR dos casos referentes à classe "Degenerativo".....	51
Tabela 23 - Distribuição de afecções neurológicas observadas e a sua respectiva frequência absoluta.....	83
Tabela 24 - Tabela-resumo das características fisiológicas do LCR. Adaptada de Lorenzs, Coates & Kent, 2011.....	88
Tabela 25 - Resultados obtidos da análise dos LCR obtidos de 4 dos 16 gatos examinados durante o estágio curricular.....	89
Tabela 26 - Resumo do processamento da análise estatística da variável "NúmeroMCD".....	90
Tabela 27 - Estatística descritiva da variável "NúmeroMCD".....	90
Tabela 28 - Testes de normalidade para a variável "NúmeroMCD".....	91
Tabela 29 - Resumo do processamento da análise estatística da variável "PesoMCD".....	92
Tabela 30 - Estatística descritiva da variável "PesoMCD".....	92
Tabela 31 - Testes de normalidade para a variável "PesoMCD".....	93
Tabela 32 - Estatística descritiva para as variáveis "NúmeroMCD" e "LCR".....	94
Tabela 33 - Ranks do teste de Mann-Whitney U para a variável "NúmeroMCD".....	94
Tabela 34 - Testes não-paramétricos para duas variáveis independentes, a saber "NúmeroMCD" e "LCR" ^a	94
Tabela 35 - Estatística descritiva para as variáveis "PesoMCD" e "LCR".....	94
Tabela 36 - Ranks do teste de Mann-Whitney U para a variável "PesoMCD".....	94
Tabela 37 - Testes não-paramétricos para duas variáveis independentes, a saber "PesoMCD" e "LCR" ^a	94
Tabela 38 - Resumo do processamento da análise estatística das variáveis "Diagnóstico" e "LCR".....	95
Tabela 39 - Tabulação cruzada das variáveis "Diagnóstico" e "LCR".....	95
Tabela 40 - Testes de Chi-quadrado entre as variáveis "Diagnóstico" e "LCR".....	95

Índice de Gráficos

Gráfico 1 - Frequências absolutas e relativas da totalidade da casuística (N = 171), de acordo com as espécies examinadas durante os 6 meses de estágio.....	42
Gráfico 2 - Frequências absolutas e relativas do grupo onde se colheu e analisou o líquido cefalorraquidiano (N=37).....	43
Gráfico 3 - Frequências relativas dos doentes com colheita de LCR (n = 37).....	44
Gráfico 4 - Frequências absolutas e relativas dos casos sem colheita de LCR (n = 106).....	44
Gráfico 5 - Frequências relativas das diferentes classes de alterações do SNC (n = 143).....	45
Gráfico 6 - Frequência absoluta de casos com LCR relacionando o número de meios complementares de diagnóstico realizados e suas respectivas classes (n = 37).	45
Gráfico 7 - Frequência absoluta de casos sem LCR relacionando o número de meios complementares de diagnóstico realizados e suas respectivas classes (n = 106).	46
Gráfico 8 - Distribuição dos casos tendo em conta a sua localização neurológica. .	82

Abreviaturas

A.C. - Antes de Cristo
BHE - Barreira hemato-encefálica
BSLCR - Barreira sangue-LCR
C1 - Primeira vértebra cervical (atlas)
CDLs - Contagem diferencial de leucócitos
CDx - Citodiagnóstico
Cél/ μ L - Células por microlitro
Cl⁻ - Ião cloro
CTC - Contagem total de células
D.C. - Depois de Cristo
DNA - *Deoxyribonucleic acid*; Português: Ácido desoxirribonucleico
FCS - soro fetal de vitelo (do inglês: fetal calf serum)
G - Gauge
HCO₃⁻ - Ião bicarbonato
HD - Hérnia discal
H₀ - Hipótese nula
H₁ - Hipótese alternativa
K⁺ - Ião potássio
pol - Polegada (do inglês *inch*; 1pol corresponde a 2,54cm)
LCR - Líquido cefalorraquidiano
MARC - Meningite-arterite responsiva a corticosteróides
MCD - Meio complementar de diagnóstico
MEG - Meningoencefalite granulomatosa
mg/dL - Miligrama por decilitro
mL - Mililitro
mL/min/g - Mililitro por minuto por grama
mm - Milímetro
mmH₂O - Milímetros de água
MV - Médico Veterinário
Na⁺ - Ião sódio
OCV - Órgãos circunventriculares
 p - Probabilidade
PC - Plexo coróide
PIC - Pressão intra-craniana
POE - Protuberância occipital externa
QA - Quociente de albumina
QV - Quarto ventrículo
RM - Ressonância Magnética
RNA - *Ribonucleic acid*; Português: Ácido ribonucleico
RRV - Clínica Veterinária Referência Veterinária (RRV, Lda.)
SN - Sistema nervoso
SNC - Sistema nervoso central
TC - Tomografia computadorizada
TV - Terceiro ventrículo
VL - Ventrículos laterais
VS - Vasos sanguíneos
 α - Nível α de significância
 μ L/min - Microlitro por minuto
[PT] - Concentração de proteína total

Parte I - Descrição das actividades desenvolvidas durante o estágio

O trabalho desenvolvido no estágio curricular¹, nas suas múltiplas vertentes, constitui a base desta dissertação. O estágio teve uma duração aproximada de seis meses (de 20 de Setembro de 2011 a 23 de Março de 2012) e foi efectuado na Clínica Veterinária Referência Veterinária (RRV).

Este estágio teve como orientador o Director clínico da clínica referenciada, o Dr. João Carlos Gil da Silva Ribeiro e incidiu exclusivamente em neurologia clínica e neurocirurgia de animais de companhia, tendo sido dado particular enfoque à componente imagiológica (estudos radiográficos simples e com contraste - mielografia - e ressonância magnética - RM) como uma ferramenta de grande importância no diagnóstico diferencial neurológico. De notar que todos os pacientes examinados na RRV procuram esta clínica para consultas de referência ou de segunda opinião.

Os objectivos fulcrais deste período de trabalho foram: alicerçar conhecimentos básicos sobre a anatomofisiologia do sistema nervoso (SN), central e periférico e a obtenção de casuística que nos permita realizar um exame neurológico sólido e preciso, que se objective na neurolocalização correcta correspondente à sede do processo que determina a avaliação neurológica.

Nesse âmbito fez parte das minhas funções como estagiário, auxiliar na realização das consultas, prestar assistência ou realizar os exames necessários a cada paciente, a par da ajuda necessária às enfermeiras ou a qualquer outro médico veterinário (MV) de serviço na clínica².

Parte II - Revisão bibliográfica

A. Objectivos

A compreensão da neuroanatomia dos animais de companhia constitui um grande desafio que por vezes desencoraja as mais entusiásticas intenções. No entanto, esse conhecimento é um dos pilares basilares dum correcta localização no SN de lesões nos doentes neurológicos (Colaço, 2003). Tentando evitar a tentação de estudar as neuropatias mais comuns, ou talvez as mais interessantes, deve-se tentar sempre aplicar a máxima usada em matemática e física: "*to go back to first principles*". Com isto em mente, esta dissertação dedicou-se a um componente do sistema nervoso central (SNC), o líquido cefalorraquidiano (LCR), revendo as suas aplicações clínicas, de modo a poder-se afinar as técnicas de colheita e as análises e aferir a importância dos resultados obtidos para a prática clínica, comparando-o com outros exames complementares de diagnóstico.

Let's go back to basics.

¹ Estágio obrigatório incluído no programa curricular do Mestrado Integrado de Medicina Veterinária, da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Técnica de Lisboa.

² Para mais informações concernentes ao estágio, consulte o Anexo 1.

B. Introdução

Devido à intimidade entre o LCR e o SNC, a colheita do LCR e sua análise (laboratorial ou imagiológica) podem providenciar elementos informativos que permitem a exclusão ou inclusão de listas de diagnósticos diferenciais possíveis (Hoerlein & Gage, 1978; Furr & Andrews, 2008). Mesmo que, por vezes, forneçam informações inconclusivas que careçam de técnicas imagiológicas, o LCR pode, ainda assim, fornecer informações importantes, principalmente na ausência de meios complementares de diagnóstico de imagem, como a mielografia, tomografia computadorizada (TC) ou a ressonância magnética (RM).

Assim sendo, é fulcral que o MV tenha em mente as técnicas de colheita (quais os locais de colheita e como escolher o mais adequado a cada caso; quais as implicações de erros na técnica de colheita), as análises que se podem realizar no LCR (quais as características fisiológicas e as alterações do LCR; o que se pode realizar na clínica e como; quando é que se deve recorrer a laboratórios externos e quais as análises a requerer). O que resultou de mais importante com a feitura desta dissertação e que se gostaria de fazer passar como mensagem é a importância de criar uma mente aberta, que analisa os sinais clínicos isoladamente, sempre mantendo um espírito crítico, de modo a realizar uma análise aos métodos utilizados, sendo sempre passível de corrigir e adaptar a metodologia caso-a-caso.

C. Revisão bibliográfica

1. Anatomohistologia

1.1 - LCR - o início

A atribuição da existência de fluido no sistema cavitário do SNC é um conceito que remonta, pelo menos, ao século XVII A.C., tendo sido mencionado no Papiro Cirúrgico Egípcio divulgado por Edwin Smith, a par das primeiras descrições de meninges, da superfície externa do cérebro e das "pulsações intracranianas" (Breasted, 1992).

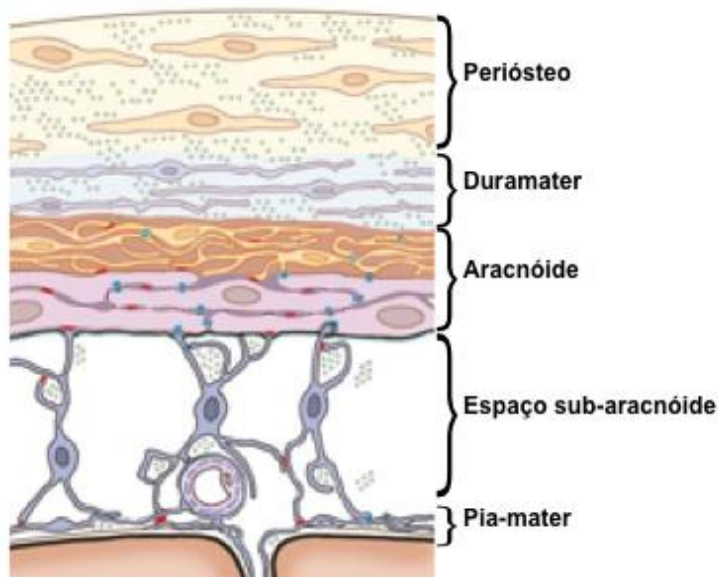
O LCR é um fluido corporal estéril que, fisiologicamente, é de aparência translúcida e límpida, protegendo, servindo de suporte e nutrindo todo o SNC (Braund, 1986; DeLahunta, 2009). Alguns autores referem que o LCR é um ultra-filtrado de plasma, embora concentração e proporção dos seus constituintes bastante díspares das do plasma sanguíneo, tendo baixo teor proteico (Furr & Andrews, 2008).

1.2 - Introdução histórica

Claudius Galenus (129 D.C. - cerca de 200 D.C.) descreveu o sistema ventricular, explicando como dissecar o cérebro de um *Bos taurus* (Finger, 1994). Durante séculos acreditou-se que este sistema de cavidades estaria cheio de um fluido chamado de "espírito vital" e, segundo Nemesius (cerca de 390 D.C.), a cada ventrículo era associada uma função diferente. Assim, a percepção aos ventrículos laterais (VL), a cognição ao terceiro

ventrículo (TV) e a memória ao quarto ventrículo (QV) (Finger, 1994; Sharples & van der Eijk, 2008). Hoje sabemos que não só o sistema ventricular cerebral, mas também o ducto central medular, o espaço subaracnóide e os espaços perivasculares estão preenchidos pelo LCR (Figura 1) (Junqueira & Carneiro, 2005; DeLahunta, 2009).

Figura 1 - Estrutura celular das meninges (Adaptado de: De Lahunta & Glass, 2009).



2 - O desenvolvimento embrionário do Sistema Ventricular Cerebral

O cérebro inicia o seu desenvolvimento embrionário a partir da parte rostral do ducto neural (Dellmann & McClure, 1986), que ao expandir dá origem a três dilatações, a saber: as vesículas cerebrais primárias, nomeadamente, no sentido rostrocaudal, o prosencéfalo, o mesencéfalo e o rombencéfalo (McGeady, Quinn, FitzPatrick & Ryan, 2006). Cada uma dessas vesículas sofrerão divisões que irão estar associadas a dilatações internas que irão formar o sistema cavitário cerebral, como está expresso na tabela 1.

Tabela 1 - Vesículas cerebrais primárias, suas respectivas subdivisões cerebrais e ventrículos associados. (Adaptado de: McGeady, Quinn, FitzPatrick & Ryan, 2006).

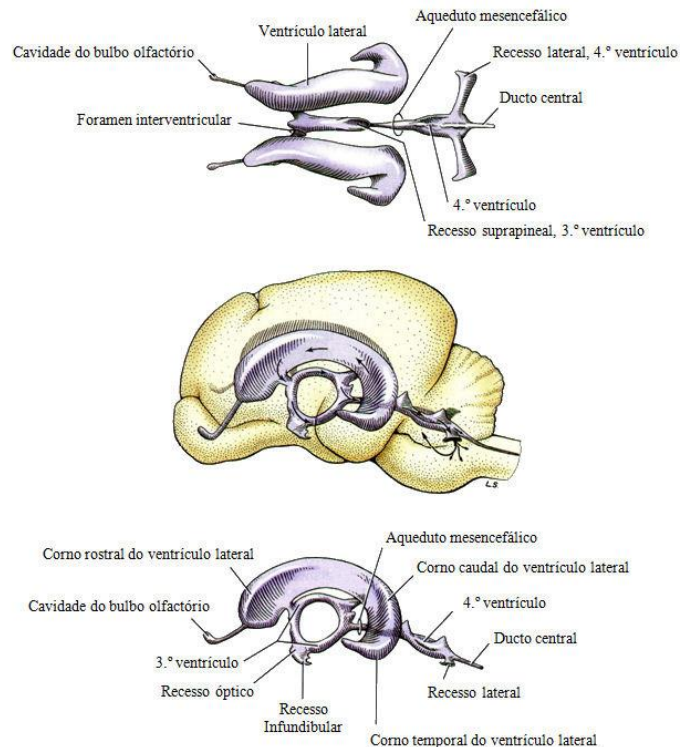
Vesículas Cerebrais Primárias	Subdivisões Cerebrais	Ventrículos Associados
Prosencéfalo	Telencéfalo	Ventrículos Laterais
	Diencefalo	Terceiro Ventrículo
Mesencéfalo	Mesencéfalo	Aqueduto Mesencefálico
Rombencéfalo	Metencéfalo	Parte rostral do Quarto Ventrículo
	Mielencéfalo	Parte caudal do quarto Ventrículo

Os VL, esquerdo e direito, acompanham o crescimento das vesículas do telencéfalo, que darão origem aos hemisférios direito e esquerdo, e compreendem o cérebro propriamente dito. Esse crescimento dá-se a nível da *lamina terminalis*, sendo que esta estrutura localiza-

se no plano mediano dos hemisférios cerebrais e é o limite rostral do TV (Fletcher 2006; DeLahunta, 2009).

O TV tem forma circular, sendo circundado pela adesão intertalâmica e comunica com cada VL através do forâmen interventricular, ou de Monro (Willis Jr., 1993; Cunningham, 1997), e com o aqueduto cerebral mesencefálico (Masty, 2008).

Figura 2 - Sistema Ventricular Cerebral Canino (Adaptado de: De Lahunta & Glass, 2009).



O aqueduto cerebral ou de Sylvius consiste numa curta e estreita estrutura tubular que se interpõe entre o terceiro e quarto ventrículos, localizados respectivamente rostral e caudalmente (Dellmann & McClure, 1986; Barone & Bortolami, 2004; Evans & DeLahunta, 2010).

O QV tem forma losangular e é delimitado dorsalmente pelo cerebelo (metencéfalo) e ventralmente pela medula oblonga (mielencéfalo). Caudalmente ao pedúnculo cerebelar caudal, esta cavidade, quando se dobra para unir os pedúnculos cerebelares esquerdo e direito e "entrar" no cerebelo, contém os chamados recessos laterais, ou de Luschka, na junção do metencéfalo com o mielencéfalo (Dellmann & McClure, 1986; Masty, 2008; DeLahunta, 2009). A Figura 2 apresenta de forma esquemática o sistema ventricular cerebral canino.

O lúmen do ducto neural também persiste durante o desenvolvimento embrionário, e dá origem ao ducto central da medula espinhal (McGeady et al., 2006).

3 - Neurohistologia

A produção do LCR é da responsabilidade de capilares sanguíneos que estão localizados por todo o SNC e também na leptomeninge (DeLahunta, 2006; King, 2005). A leptomeninge é a designação dada ao conjunto das duas meninges mais internas, dos três estratos constituintes das meninges. Por sua vez, as meninges são definidas como o conjunto de membranas que revestem o SNC e que se situam abaixo do perióstio dos ossos do crânio. As meninges dividem-se, do exterior para o interior da seguinte forma: duramáter (contínua com o perióstio do crânio, mencionando-se o espaço sub-dural apenas como um espaço virtual); pela aracnóide (constituída por um estrato celular em contacto com a duramáter e por um sistema trabecular); e pela pia-mater. Estas duas últimas estão interligadas e são muitas vezes denominadas por pia-aracnóide ou leptomeninge, como mencionado anteriormente (Schadé & Ford, 1971; Jenkins, 1972; Burkitt, Young & Heath, 1994; Fletcher, 1998; Junqueira & Carneiro, 2005; King, 2005; Fletcher, 2013).

As trabéculas da aracnóide realizam as ligações entre esta e a pia-mater, e os espaços inter-trabeculares são designados por espaço subaracnóide, onde se encontra e flui o LCR (Junqueira & Carneiro, 2005; King, 2005; Fletcher, 2013).

São apenas as células ependimogliais que estabelecem contacto com a superfície dos ventrículos (Reichenbach & Wolburg, 2004; Del Bigio, 2010; Wolburg & Paulus, 2010). As regiões do chão de cada VL, contínuas com as do teto do TV e o terceiro e quarto ventrículos têm como revestimento células ependimais e a pia mater vascular - que em conjunto compõem as telas da coróide (Barone & Bortolami, 2004; King, 2005; Cauzinille, 2007; Fletcher, 2013). O epitélio destas telas, composto por células não-neuronais e originando-se da neuroectoderme, constitui um subtipo de macroglia³ (Banks, 1993). Projecções das telas da coróide invadem os ventrículos formando estruturas vilosas - os plexos coróides (PC) (McGeady et al., 2006). Os PC consistem numa monocamada celular, cubóide a colunar, incorporada em tecido conjuntivo que pode ser visto como a interface entre o sangue e o LCR na medida em que consiste num epitélio fortemente aderente envolvendo um estroma sanguíneo (Strazielle & Gherzi-Egea, 2000; Damkier, Brown & Praetorius, 2010). Essas células contêm cílios que se projectam para o interior dos ventrículos e têm movimento coordenado no sentido do fluxo do LCR (Storts & Montgomery, 2001).

Dentro de cada ventrículo, os PC diferem na sua morfologia. Assim sendo, verifica-se que nos VL o PC é formado por uma estrutura ondulada, fina como uma folha, contrariamente ao TV e QV em que o PC é composto por inúmeras vilosidades (King, 2005; Damkier et al., 2010; Wolburg & Paulus, 2010). No caso do TV, o PC faz saliência do tecto da cavidade e, em termos de complexidade, encontra-se num estado intermédio comparando com os

³ As células da macroglia incluem os astrócitos, os oligodendrócitos e as células ependimogliais (Banks, 1993; Wolburg & Paulus, 2010).

outros ventrículos, sendo que o PC do QV é o mais lobulado e complexo, localizado caudoventralmente ao cerebelo (Wolburg & Paulus, 2010). De notar que, contrariamente ao que acontece com as células endodimais no geral, o epitélio do PC contém microvilosidades em grande número e longas em comprimento, enquanto que cílios isolados ou grupos de cílios são raramente observados (Wolburg & Paulus, 2010).

O suporte sanguíneo do PC é garantido pelas artérias coróides que são ramos da artéria carótida interna (Praetorius, 2007). Os capilares do SNC são morfologicamente iguais aos capilares de todo o organismo, com células endoteliais sobre uma membrana basal. O endotélio capilar não é fenestrado, excepto no PC (Burkitt et al., 1994), garantindo uma grande permeabilidade, o que representa a base fisiológica para a produção do LCR (Wolburg & Paulus, 2010). Os capilares fenestrados juntamente com a lâmina basal, tecido conjuntivo laxo e células epiteliais formam a barreira sangue-LCR (BSLCR), enquanto que a barreira-hemato-encefálica (BHE) é constituída pelo endotélio capilar não fenestrado do SNC, pela astroglia, lâmina basal, perícitos e macrófagos perivasculares (Furr & Andrews, 2008; Damkier et al., 2010). A Figura 3 mostra um desenho esquemático de ambas as barreiras e das estruturas que as constituem.

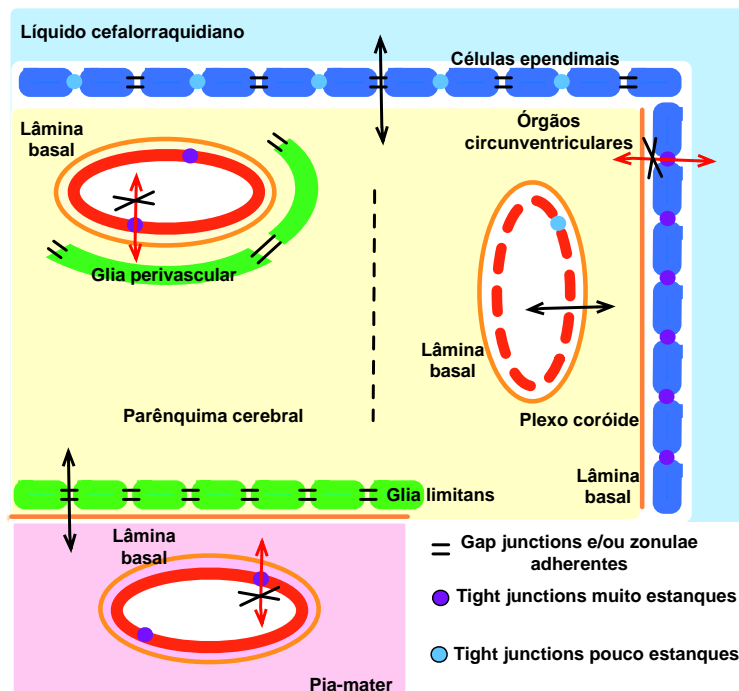
3.1 - A BHE e a BSLCR

A existência destas barreiras foi o resultado do estudo de Paul Ehrlich (1885). Através desse estudo foi possível concluir que a injeção intravenosa de um corante ácido não corou o parênquima cerebral, com excepção do PC e dos órgãos circumventriculares (OCV)⁴. Complementando este estudo, Edwin Goldwin (1993), colaborador de Ehrlich, utilizou o corante azul de triptano, porém injectou-o directamente no LCR verificando que o PC e os OCV não foram tingidos, mas que o parênquima cerebral sim (Wilson & Oehninger, 2007; Wolburg & Paulus, 2010).

É devido a existência de conexões celulares que se torna compreensível o facto de todas as trocas que ocorrem entre o sangue, o parênquima cerebral e LCR serem altamente selectivas (Cunningham, 1997). Tendo especial atenção apenas ao LCR, tem-se sempre que diferenciar o PC de todas as outras áreas de contacto entre o LCR e o parênquima cerebral. De grosso modo, no PC a BSLCR é muito permeável ao oxigénio, ao dióxido de carbono, à água e à grande maioria de substâncias lipossolúveis como o álcool e os anestésicos (Guyton & Hall, 2000). Por outro lado, quando apenas existem células endodimárias com *gap junctions* e *zonulae occludens* pouco estanques, essas ligações tornam possíveis a difusão de moléculas com maiores pesos moleculares e dimensões (Nicholls, Martin & Wallace, 1992). As diferentes permeabilidades e estruturas moleculares são directamente responsáveis pela produção ou funções do LCR.

⁴ Existem seis OCV, a saber: a glândula pineal, a área postrema, o órgão subcomissural, o órgão subfornical, o *organum vasculosum* da lâmina terminal e neurohipófise (Fuller & Burger, 2007; Ross et al., 2003a)

Figura 3 - Representação esquemática das BHE e BSLCR presentes no SNC. O parênquima cerebral (a amarelo) tem a componente vascular (capilares contínuos) rodeada pela lâmina basal (LB) e pela glia perivascular - a astroglia com os seus processos podais e os perícitos (Willis Jr., 1993; Ross, Kaye & Pawlina, 2003a; King, 2005; Mathiisen, Lehre, Danbolt & Ottersen, 2010). Esses constituintes celulares, juntamente com a presença de *zonulae occludens* entre as células endoteliais dos vasos sanguíneos (VS) cerebrais formam a BHE (Fletcher, 1998; Ross et al. 2003b; King, 2005). As células ependimais formam o revestimento do espaço ventricular na superfície interna cerebral e do canal central medular (Fletcher, 1998; Del Bigio, 2010; Ressel, 2010). Porém, estas células não são uma barreira fisiológica e estabelecem interconexões através de *gap junctions* e de *zonulae occludens* pouco estanques. A *glia limitans*, ou membrana limitante glial (constituída em conjunto por processo podais astrogliais interligados por *gap junctions*), forma o limite externo do parênquima cerebral com as meninges. Contudo, a *glia limitans* também não tem propriedades de barreira (Del Bigio, 2010; Wolburg & Paulus, 2010). Os VS da pia-mater são protegidos pela BHE contrariamente aos VS do PC onde não existem barreiras para que o LCR possa ser produzido a partir do sangue. Porém, para prevenir as trocas entre o sangue e o LCR, existe a BSLCR composta por *zonulae adherens* e *zonulae occludens* entre as células epiteliais do PC e os tanócitos - literalmente células esticadas - nos OCV (Dellmann & Carithers, 1996; Fletcher, 1998; Fuller & Burger, 2007). Os capilares desses órgãos e do PC são fenestrados e extremamente permeáveis (Wolburg & Paulus, 2010). (Adaptado de Wolburg & Paulus, 2010).



4 - Produção do LCR

As opiniões dividem-se quanto à classificação do LCR. Classicamente, o LCR é descrito como um ultrafiltrado de plasma (Wamsley & Alleman, 2004; Furr & Andrews, 2008; DeLahunta, 2009). No entanto, pelas conclusões retiradas por Rougemont e seus colegas (1960), o LCR não deve ser assim considerado visto ser mais hipertônico do que o plasma e porque as concentrações dos íons sódio, potássio, cloro e bicarbonato são diferentes das concentrações esperadas de um ultrafiltrado (Damkier et al., 2010).

Contudo, existe consenso científico no facto de que o LCR é produzido, principalmente, pelo epitélio dos PC ventriculares (Detweiler, 1989; Willis Jr., 1993; Cunningham, 1997; Damkier et al., 2010). Um estudo determinou que 58% do LCR é produzido pelos PC dos ventrículos (23% pelo QV e os restantes 35% pelos VL e TV, em conjunto). O mesmo estudo refere que 42% do LCR tem origem no próprio espaço subaracnóide (DeLahunta, 2009). Mais especificamente, para além dos PC, o LCR é secretado pelas superfícies ependimais dos ventrículos, pelos capilares da leptomeninge (Detweiler, 1989; Chrisman, 1991; Cunningham, 1997; DeLahunta, 2009), pelos VS cerebrais e medulares (Bailey & Vernau, 1997; Furr & Andrews, 2008) e ainda pelos espaços perivasculares que rodeiam os VS que entram no cérebro (Guyton & Hall, 2000).

A produção de LCR resulta do conjunto de vários processos bioquímicos, a saber: difusão facilitada e transporte activo, com mecanismos celulares que requerem gastos energéticos (Smith & Kampine, 1990), o que explica o grande número de organitos celulares (mitocôndrias, retículos endoplasmáticos rugoso e liso e complexos de Golgi) presentes no epitélio dos PC (Dellmann & Carithers, 1996). Toda esta mecânica celular baseia-se em canais de transporte de iões, nomeadamente de sódio (Na^+), potássio (K^+), cloro (Cl^-) e bicarbonato (HCO_3^-), que funcionam de modo extremamente eficiente (Damkier et al., 2010). A secreção do LCR é independente da pressão hidrostática vascular e pressão intraventricular, mas depende do gradiente osmótico resultante das movimentações iónicas (Cunningham, 1997; Johnston & Papaiconomou, 2002; Furr & Andrews, 2008; Wolburg & Paulus, 2010), sendo que quaisquer substâncias que alterem a osmolaridade do LCR resultam em variações na taxa de produção do mesmo (Braund, 1986; Ducoté & Dewey, 2008; Furr & Andrews, 2008).

O transporte activo de iões Na^+ pelo endotélio do PC para os ventrículos é o grande responsável pelo gradiente osmótico que permite a produção do LCR (Masuzawa, Ohta, Kawamura, Nakahara, & Sato, 1984; Ernst, Palacios & Siegel, 1986; Cunningham, 1997; Guyton & Hall, 2000). Através de canais específicos, o Na^+ é transportado, juntamente com Cl^- , HCO_3^- e K^+ , garantindo assim a concentração iónica necessária para o movimento selectivo de água através do "sistema de canalização celular" - as aquaporinas (Dreifus, 2009; Damkier et al., 2010; Del Bigio, 2010; Wolburg & Paulus, 2010; Keep & Smith, 2011).

Outros processos, como o transporte da glicose do sangue para o LCR, também ocorrem porém, com importância relativa e comparada muito menor (Guyton & Hall, 2000).

O LCR é produzido a uma taxa constante. Existem variações entre espécies, mas foi estimado que a taxa de produção de LCR no cão é de cerca de 0,05 mililitro, por minuto, por grama ($\text{ml}/\text{min}/\text{g}$), uma taxa média de 47 a 66 microlitro por minuto ($\mu\text{L}/\text{min}$) (Oppelt, Patlak & Rall, 1964; Ducoté & Dewey, 2008; Furr & Andrews, 2008; DeLahunta, 2009).

5 - Fluxo

Visto que a produção do LCR é contínua, há constantemente um deslocamento de fluido "antigo" - fluxo de massa - que será drenado para a circulação sistêmica via sinusóides durais (Cunningham, 1997; Damkier et al., 2010). Desde o seu local de secreção, o LCR circula pelo sistema ventricular. Com maior pormenor, iniciando o fluxo nos VL, o LCR flui para o TV passando pelos forâmens interventriculares, misturando-se com o LCR aqui produzido e continuando para o QV através do aqueduto mesencefálico. Do QV, saindo pelos recessos laterais ou de Luschka, o LCR flui para a cisterna⁵ magna ou cerebelomedular, entre o cerebelo e a medula oblonga. (Chrisman, 1991; Schaller, 1999; Guyton & Hall, 2000; King, 2005). Daí então flui para o espaço subaracnóide que rodeia o cérebro e a medula espinhal (Smith & Kampine, 1990; Willis Jr., 1993; Cunningham, 1997; DeLahunta, 2009; Fletcher, 2013).

O fluxo do LCR no espaço subaracnóide também é dependente das alterações de pressão das cavidades torácica e abdominal, da sístole cardíaca e das pulsações arteriais intracranianas. Relacionando a sístole com expiração e a diástole com a inspiração, o LCR pode movimentar-se caudal e cranialmente, respectivamente. Porém, o fluxo caudal é o que predomina, em parte devido aos efeitos gravitacionais (Buser & Imbert, 1975; Thomson, Kornegay & Stevens, 1990; DeLahunta, 2009; Fletcher, 2013). Este fluxo também é auxiliado pelos cílios (cilia) presentes nas células endoteliais (Schadé & Ford, 1971).

Do espaço subaracnóide, algum líquido passa ao longo da medula espinhal, sendo que a maior parte flui por cima da convexidade do cérebro (Cunningham, 1997), passando dorsalmente ao cerebelo, ventral ao tentorium e por cima do cérebro onde tem acesso às vilosidades aracnóides nas paredes dos seios venosos (Guyton & Hall, 2000; Furr & Andrews, 2008; DeLahunta, 2009).

6 - Absorção

O parênquima cerebral e a medula espinhal são desprovidos de vasos linfáticos (Johnston & Papaiconomou, 2002). O LCR é absorvido de três formas: pelas vilosidades aracnóides, pelas vênulas no espaço subaracnóide e pela circulação linfática de alguns nervos cranianos e raízes nervosas (Hoerlein & Gage, 1978; King, 2005).

As vilosidades aracnóides são saliências da aracnóide que perfuram a duramáter de modo a atingir os seios venosos, nomeadamente o seio venoso longitudinal, ou sagital, superior (Burkitt et al., 1994; Ortiz, 2004; Junqueira & Carneiro, 2005; King, 2005). Ao conjunto das vilosidades aracnóideais dá-se a denominação de granulações aracnóides (Schadé & Ford, 1971; Guyton & Hall, 2000; Johnston & Papaiconomou, 2002; Rosenberg, 2004; DeLahunta, 2009). O endotélio dessas granulações apresenta vesículas grandes o suficiente para

⁵ Regiões onde o espaço subaracnóide se encontra distendido fisiologicamente denominam-se cisternas (Schadé & Ford, 1971; Willis Jr., 1993; Schaller, 1999).

possibilitarem o fluxo livre de moléculas proteicas, LCR e, até mesmo de células como os eritrócitos e os leucócitos (Guyton & Hall, 2000).

Pollay e Welch (1962) descrevem que estas vilosidades funcionam como válvulas unidireccionais que permitem o fluxo de LCR para o lúmen do seio venoso quando a pressão de LCR excede a pressão venosa (Schadé & Ford, 1971; Hoerlein & Gage, 1978; Smith & Kampine, 1990; Furr & Andrews, 2008; DeLahunta, 2009). Quando a pressão venosa ultrapassa a pressão de LCR as vilosidades colapsam, impedindo que o sangue passe para o espaço subaracnóideu (Fletcher, 1998; DeLahunta, 2009; Fletcher, 2013). A pressão de LCR, que fisiologicamente apresenta valores entre 80 a 150 mmH₂O (milímetros de água), é determinada pela taxa de secreção e de absorção (Detweiler, 1989). Deste modo, qualquer ocorrência que interfira com a drenagem venosa ou do LCR, alterando a normal circulação ou obstruindo a passagem de LCR, como um traumatismo ou uma lesão que ocupe espaço por efeito de massa, pode aumentar a pressão do LCR e ter como consequência, por exemplo, a hidrocefalia obstrutiva (Detweiler, 1989; Chrisman, 1991; Willis Jr., 1993; King, 2005; Del Bigio, 2010). Por outro lado, quando a pressão do LCR diminui, atingindo valores inferiores a 60 mmH₂O, a absorção cessa (Rosenberg, 2004). Esta absorção é classificada como a absorção primária do LCR (Wilson & Oehninger, 2007). As vênulas do espaço subaracnóideu também realizam a absorção de LCR, essencialmente devido à pressão osmótica e à pressão venosa sanguínea (King, 2005). Outros locais de absorção de LCR incluem a circulação linfática ao redor das raízes nervosas e dos nervos espinhais nos forâmens intervertebrais e associados aos pares cranianos I, II e VIII quando eles passam pelos ossos do crânio, embora com menor importância (Johnston & Papaiconomou, 2002; King, 2005; Wilson & Oehninger, 2007; DeLahunta, 2009; Fletcher, 2013). Para além disso, o LCR também passa pela lâmina cribiforme do etmóide, sendo aí absorvido, caso contrário ocorre o que se denomina de rinorréia onde o LCR escoia pela cavidade nasal. Ainda uma quantidade ínfima de LCR no espaço intersticial pode ser absorvido pelos VS do parênquima cerebral (Hoerlein & Gage, 1978; Zhang, Richards, Kida & Weller, 1992; Johnston & Papaiconomou, 2002; DeLahunta, 2009).

7 - O LCR e as suas funções

Todos estes mecanismos fisiológicos que garantem o fluxo e circulação do LCR são os responsáveis por uma importante função desempenhada por este fluido corporal: O LCR é um lugar de intercâmbio e excreção (Schadé & Ford, 1971; Cauzinille, 2007; Ruotsalo, Poma, da Costa & Bienzle, 2008). Não só na cavidade craniana, mas em toda a extensão do SNC, ele serve como meio de transporte a uma variedade de compostos, desde neurotransmissores (Furr & Andrews, 2008), a produtos resultantes do metabolismo celular do SNC, a neuro-hormonas e nutrientes entre o sangue e o parênquima do SNC (Ducoté & Dewey, 2008), até mesmo a células e restos celulares resultantes da descamação do

epitélio e, em caso de afecções, podemos encontrar agentes etiológicos e células resultantes de reacções inflamatórias/infecciosas caso as BHE/BSLCR tenham sido corrompidas (Jenkins, 1972; Radaelli & Platt, 2002; Vandevelde, Jaggy & Lang, 2003; Nghiem & Schatzberg, 2010).

Como mencionado, o PC é responsável por várias trocas iónicas entre o sangue e o LCR, de modo que este líquido exerce uma função muito importante como tampão químico para o parênquima (Cauzinille, 2007; DeLahunta, 2009; Keep & Smith, 2011). Ele regula o ambiente químico onde o SNC se encontra, mantendo assim o equilíbrio iónico necessário para o funcionamento neuroglial. É assim que o LCR garante um maior controlo e uma maior estabilidade iónica/química do que o plasma sanguíneo, funcionando também como um "sistema linfático", o que é designado por *sink-action* (Hoerlein & Gage, 1978; Fletcher, 1998; Furr & Andrews, 2008; Ruotsalo et al., 2008; DeLahunta, 2009; Keep & Smith, 2011).

Sobre o equilíbrio iónico, principalmente no que diz respeito às concentrações dos iões H^+ e HCO_3^- , é descrito que o LCR também pode ter alguma acção nos centros respiratórios, visto que os estudos de Mitchell (1963) e de Pappenheimer (1965), e seus respectivos associados, localizam receptores sensíveis à concentração de H^+ no LCR à superfície e abaixo da superfície da medula oblonga (Jenkins, 1972).

Através de propriedades mecânicas e hidráulicas o LCR é responsável por minimizar os efeitos das alterações de pressão, quer intracraniana (PIC), quer no canal vertebral (Schadé & Ford, 1971; Cauzinille, 2007; Furr & Andrews, 2008).

A densidade do LCR (1.004 – 1.006) e a sua pressão hidrostática garantem suporte físico (flutuabilidade) e o amortecimento de choques e traumatismos do SNC, por exemplo, reduzindo eficazmente o peso normal do cérebro até trinta vezes (Hoerlein & Gage, 1978; Furr & Andrews, 2008).

Também foi sugerido por Fankhauser (1962) que o LCR possui propriedades bactericidas e anti-tóxicas e *in vitro* também mielinolíticas (Fankhauser, 1962; Jenkins, 1972).

Como muitas afecções do SNC podem modificar a composição normal do LCR, pode-se dizer então que uma das funções/aplicações clínicas do LCR é servir como indicador de alterações do SNC, daí a importância da realização da sua colheita (Jenkins, 1972).

8 - Colheita de LCR

O LCR é o único produto tecidual, facilmente acessível, passível de sofrer alterações em afecções do SNC (Parent, 1999). A sua colheita é um dos exames invasivos em neurologia que está ao dispor dos médicos veterinários (Cauzinille, 2007). No entanto, ela não é feita rotineiramente por muitos na prática clínica diária, embora o material e a técnica necessárias não estejam fora do alcance da maioria (Cook & DeNicola, 1988; Lorenz, Coates & Kent, 2011a).

8.1 - Indicações para colheita

A análise do LCR é sensível para a detecção de alterações do SNC, embora não ocorram consistentemente modificações na sua constituição em todas as afecções neurológicas centrais. (Wamsley & Alleman, 2004; Cauzinille, 2007; DeLahunta, 2009; Di Terlizzi & Platt, 2009; Lorenzs et al., 2011a). De qualquer forma, sempre que se suspeite de uma afecção do SNC com causa desconhecida, justifica-se a colheita de LCR, mesmo que não ocorram alterações em outros exames preliminares, como o hemograma e o exame de bioquímicas séricas (Coles, 1979; Parent, 1999; Freeman, 2005; Di Terlizzi & Platt, 2009).

Na generalidade, lesões neoplásicas, traumáticas, vasculares, inflamatórias (infecciosas ou não-infecciosas) causam alterações no LCR (Ruotsalo et al., 2008; Di Terlizzi & Platt, 2009; Marcos & Santos, 2011).

Encefalopatias, geralmente, são indicações de colheita e análise de LCR, em particular se se suspeitar de etiologia inflamatória, infecciosa ou não-infecciosa, visto que ocorrem alterações na celularidade e no teor proteico (Ducoté & Dewey, 2008).

Lesões na medula espinal (mielopatias), sejam focais, multifocais ou difusas, podem levar a modificações do estado normal do LCR. Porém, é importante que a colheita seja feita antes da administração de contraste para mielografia, visto que a injeção do mesmo tem como consequência a alteração do LCR durante três a cinco dias (Parent, 1999; Cauzinille, 2007; Ducoté & Dewey, 2008; DeLahunta, 2009).

As radiculopatias também podem ser indicações de análise de LCR, tendo em conta que as meninges envolvem as raízes nervosas distalmente até passarem a ser nervos periféricos (Ducoté & Dewey, 2008).

Lesões congénitas, degenerativas, nutricionais, metabólicas, tóxicas ou idiopáticas podem não causar alterações no LCR. Mesmo assim, nessas situações, a análise do líquido pode ser importante, tendo poder diagnóstico de exclusão (Lorenzs et al., 2011a; Marcos & Santos, 2011).

A análise repetida e seriada de LCR do mesmo doente pode ser um óptimo método para avaliar a sua resposta ao tratamento, assim como para obter dados para basear uma cessação da terapêutica (Coles, 1979; Parent, 1999).

8.2 - Técnica de colheita

8.2.1 - Generalidades

A colheita é realizada após a anestesia geral de modo a garantir a contenção do animal, para além de diminuir o desconforto da punção (Jenkins, 1972; Braund, 1986; Freeman, 2005, DeLahunta, 2009). O protocolo anestésico a utilizar deve ter em consideração o tipo de doente e ser adaptado de modo a evitar ao máximo complicações. Por exemplo, em animais com suspeita de aumento da PIC, embora seja um assunto controverso, como mostra o estudo de Mayberg (1995), deve-se evitar o uso de ketamina na pré-medicação pois diminui

a pressão de perfusão cerebral, aumenta a frequência cardíaca, a pressão de LCR e a PIC, aumentando o risco de hérnia (Dawson, Michenfelder & Theye, 1971; Shapiro, Wyte & Harms, 1972; Schwedler, Miletich & Albrecht, 1982; Mayberg, Lam, Matta, Domino & Winn, 1995; Muir, Hubbel, Skarda & Bednarski, 2000; Wamsley & Alleman, 2004).

Para a correcta e segura colheita de LCR é necessário que o clínico tenha perfeito conhecimento das estruturas anatómicas e da técnica precisa (Coles, 1979). O animal deve ser posicionado⁶ em decúbito lateral direito, com o dorso junto à borda da mesa (Jenkins, 1972; Braund, 1986; Wamsley & Alleman, 2004).

É essencial que a técnica seja realizada com a maior assépsia possível. A região a puncionar deve ser preparada realizando-se a tricotomia e desinfecção da mesma, de forma semelhante à assépsia cirúrgica (Jenkins, 1972; Braund, 1986; Vandeveldet et al., 2003, DeLahunta, 2009). Para não comprometer as condições assépticas, o MV deve usar luvas estéreis (Bradley, Daroff, Fenichel & Jankovic, 2004; Freeman, 2005; DeLahunta, 2009).

Podem ser retirados com segurança, aproximadamente 1 a 2 mL de LCR⁷, não sendo indicada a colheita por aspiração (pressão negativa) por aumentar o risco de dano celular e hemorragia, hérnia, coma e até morte (Braund, 1986; Chrisman, 1991; Vandeveldet et al., 2003; Wamsley & Alleman, 2004).

Durante o procedimento o animal deve ser mantido totalmente imóvel, visto que a movimentação da agulha pode causar danos, por vezes irreversíveis. Porém, se fôr necessário aumentar-se o fluxo de LCR durante a colheita, pode proceder-se à aplicação de pressão digital na jugular (Braund, 1986).

As amostras de LCR são mais susceptíveis de estar alteradas, ou de fornecer dados preciosos, quando são obtidas caudalmente à lesão. Esse facto rege a escolha do local a puncionar, obviamente, analisando os doentes caso-a-caso (Thomson et al., 1990; Wamsley & Alleman, 2004; Di Terlizzi & Platt, 2009).

8.2.2 - Cisterna cerebelomedular (atlanto-occipital)

A punção na cisterna cerebelomedular é a técnica mais comumente realizada e a descrita por alguns autores como sendo a melhor (Braund, 1986; Christmas, 1991; Lamb, Croson, Cappello & Cherubini, 2005; Platt, Dennis, Murphy & Stefani, 2005).

Após a preparação do paciente, ele deve ser posicionado em decúbito lateral direito, com a cabeça flectida, num ângulo de cerca de 90 graus com a coluna. O nariz é elevado de modo a que o focinho se mantenha paralelo à mesa (ao plano sagital). É extremamente importante ter cuidado com flexão excessiva do pescoço devido ao risco de comprometer a respiração e para evitar dobras no tundo endotraqueal, o que irá interferir com a anestesia (Jenkins, 1972; Braund, 1986; Wamsley & Alleman, 2004; Cauzinille, 2007; DeLahunta, 2009). Para prevenir esta complicação pode-se utilizar tubos endotraqueais flexometálicos, feitos de

⁶ Todos os posicionamentos para a punção e colheita de LCR são descritos para pessoas com mão dominante esquerda.

⁷ Um mililitro de LCR por cada 5 Kg de peso vivo (Chrisman, 1991; Ducoté & Dewey, 2008; Di Terlizzi & Platt, 2009).

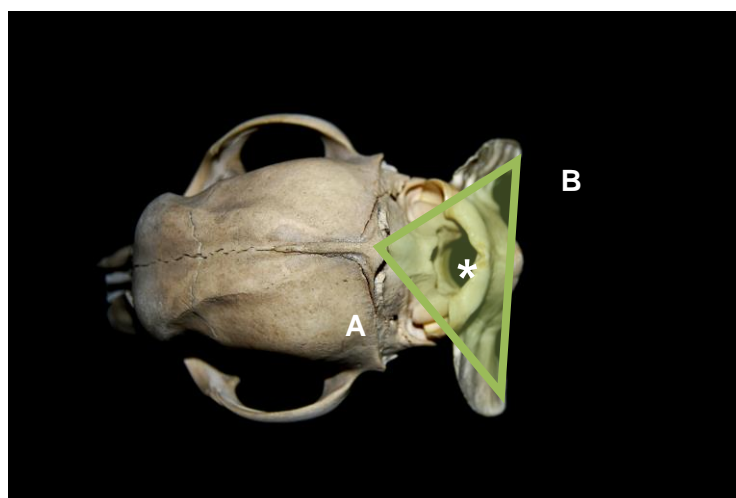
silicone com um fio de nylon ou aço incorporado de modo a resistir a dobras e colapso (Clutton, 1999; Ducoté & Dewey, 2008; Di Terlizzi & Platt, 2009).

A escolha das agulhas varia de acordo com o tamanho e peso do animal. Geralmente, para a maioria dos cães são utilizadas agulhas espinhais com mandril, com cerca de 40 milímetros (mm) (1½ polegadas (pol)) de comprimento e 20 a 22 gauge (G). Por vezes, pode ser necessário recorrer-se a agulhas entre 50 mm (2 pol) a 90 mm (3½ pol) para cães com peso superior a 25 Kg, raças gigantes ou animais obesos de raças médias. Para cães com peso inferior a 8 Kg recomenda-se a utilização de catéteres com 15 mm (0,5 pol) de 22 G (Braund, 1986; Vandeveldel et al., 2003; Desnoyers, Bédard, Meinkoth & Crystal, 2008).

As referências anatómicas para a punção são a protuberância occipital externa (POE) e as asas do atlas (primeira vértebra cervical - C1) (Jenkins, 1972; Duncan, Oliver, Mayhew, 1987). Posiciona-se o polegar da mão direita na POE, o indicador e o dedo médio cada um numa das asas de C1, formando um triângulo imaginário. O ponto central da área desse triângulo, ou melhor, o ponto médio da altura desse triângulo, é o local a puncionar (Figura 4). Com o bísel direccionado para um dos lados, a agulha é inserida, perfurando a pele, a fáscia e o músculo, dirigindo-a para o ângulo da mandíbula (Braund, 1986; Chrisman, 1991; Vandeveldel et al., 2003; DeLahunta, 2009; Di Terlizzi & Platt, 2009).

Sente-se uma ligeira resistência ao penetrar a membrana atlanto-occipital e a duramáter, em simultâneo (Braund, 1986; Vandeveldel et al., 2003; Di Terlizzi & Platt, 2009). A profundidade de inserção da agulha varia com a espécie e raça do doente. De grosso modo, diz-se que a profundidade para cães pequenos é de cerca de 0,5 a 1 cm, e 2 a 4 cm para cães de raças grandes ou gigantes (Braund, 1986; DeLahunta, 2009). O estilete da agulha é então retirado com a mão esquerda e o LCR pode fluir pela agulha, sendo recolhido para um tubo estéril (Di Terlizzi & Platt, 2009; Lorenzs et al., 2011a). Quanto mais prática o operador tem, menor risco está associado a esta técnica (Chrisman, 1991).

Figura 4 - Referências anatómicas para a colheita de LCR na cisterna atlanto-occipital. O A identifica a protuberância occipital externa e a B estão identificadas ambas as asas do atlas. O asterisco marca o centro do triângulo e é o local de inserção da agulha para colheita de LCR (Figura original).



8.2.3 - Cisterna lombar

A colheita por punção lombar é descrita como sendo mais segura do que a técnica descrita para a cisterna cerebelomedular (Kishimoto, Yamada, Ueno, Kobayashi & Wisner, 2004). Se o animal sofre de alguma afecção medular é indicado fazer-se punção e colheita lombar porque está mais próximo da lesão (Vandeveldt et al., 2003).

A escolha da agulha deve variar de acordo com o porte do animal. De um modo geral, as agulhas recomendadas são as agulhas espinhais de 40 mm ou 55 mm e 20 a 22 G (Braund, 1986; Vandeveldt et al., 2003; Desnoyers et al., 2008).

A punção lombar baseia-se na mesma técnica para a administração de contraste para mielografia. O local ideal de inserção da agulha varia consoante os autores. Segundo Duncan, Oliver & Mayhew (1987), entre outros, a agulha é inserida no espaço intervertebral L5-L6 nos cães (Ramirez & Thrall, 1998; Cauzinille, 2007; Di Terlizzi & Platt, 2009). Outros autores referem os espaços L4-L5 em cães de raças grandes e gigantes, e L5-L6 em cães de raça pequena (Ducoté & Dewey, 2008). O que determina o local da punção nesta técnica é a relação entre os segmentos espinhais lombossagrados e as vértebras no animal adulto (Tabela 2).

O espaço subaracnóide no *conus medularis* é mais pequeno dificultando a colheita e tornando susceptível a contaminação sanguínea iatrogénica, embora esta não esteja associada a grandes riscos de lesão medular, nem a sinais clínicos (Jenkins, 1972; Spano & Hoerlein, 1978; Braund, 1986; Duncan, Oliver, Mayhew, 1987; Di Terlizzi & Platt, 2009).

Tabela 2 - Relação entre os segmentos espinhais lombossagrados e as vértebras no cão adulto. Adaptado de De Lahunta & Glass, 2009).

Número de segmentos sagrados	Número de vértebras lombares	Localização dos segmentos sagrados	Segmentos sagrados na transição lombossagrada
3	7	L5	Nenhum

O animal deve ser posicionado em decúbito lateral direito com a coluna lombar ligeiramente arqueada, flectindo-se os membros pélvicos (Braund, 1986; Di Terlizzi & Platt, 2009). Após a preparação do local da punção é necessário localizar-se as estruturas que servem como referências anatómicas. Primeiro, é necessário identificar-se a crista do íleo. Imediatamente cranial à crista encontra-se o processo espinhal da vértebra L6. Assim, dependendo da escolha do MV, pode-se facilmente encontrar a articulação intervertebral desejada. A agulha é, então, posicionada na linha média, cranial ao processo espinhal e inserida direccionada cranialmente, num ângulo de, aproximadamente, 45 graus (Wamsley & Alleman, 2004). Depois de penetrar o ligamento amarelo a agulha deve entrar no canal medular. Esta fase de perfuração pode estar associada a uma resistência, maior ou menor, podendo mesmo não se sentir resistência em particular (Braund, 1986; Di Terlizzi & Platt, 2009). Pode-se

sentir uma ligeira contracção da cauda ou de um dos membros pélvicos pela estimulação de uma raiz nervosa ou cauda equina pela inserção da agulha (Di Terlizzi & Platt, 2009; Wood, Garosi & Platt, 2012).

Caso não haja saída de LCR pode-se proceder à ligeira e cuidadosa rotação da agulha e/ou retirar-se a mesma alguns milímetros até que se veja LCR. No entanto, a taxa de fluxo e a quantidade de LCR que se obtém na punção lombar é geralmente inferior do que na colheita na cisterna cerebelomedular (Di Terlizzi & Platt, 2009).

8.4 - Contra indicações

Ambas as técnicas descritas são realizadas sob anestesia geral, de modo que se a anestesia for uma contra indicação deve-se medir bem o risco-benefício antes de se decidir realizar a colheita de LCR. Aqui estão incluídos os doentes com afecções intracranianas (Ducoté & Dewey, 2008; Di Terlizzi & Platt, 2009; Lorenzs et al., 2011a).

Um risco específico da punção é o traumatismo iatrogénico do tronco cerebral ou da medula oblonga pela inserção da agulha (Wamsley & Alleman, 2004; Platt et al., 2005; Luján Feliu-Pascual, Garosi, Dennis & Platt, 2008; Di Terlizzi & Platt, 2009).

A assépsia da técnica deve ser garantida para prevenir a possível introdução de agentes infecciosos dentro do SNC (Cook & DeNicola, 1988; Di Terlizzi & Platt, 2009). É por isso que uma contra indicação à punção é a existência de infecção cutânea a nível da região a puncionar (Coles, 1979).

A colheita também não é aconselhável em casos de aumento da PIC, como por exemplo em animais com traumatismos (Christmas, 1991; Rand, Parent, Percy & Jacobs, 1994; Vandeveldt et al., 2003). O aumento da PIC pode estar associada a hérnias transtentoriais ou cerebelares. Com isto, torna-se óbvio que em doentes em que *a priori* já se saiba ou suspeite de herniações a colheita de LCR está contra indicada (Rand et al., 1994; Luján Feliu-Pascual et al., 2008; Di Terlizzi & Platt, 2009). E o mesmo se aplica a animais com suspeitas de massas que ocupem espaço, hemorragias intracranianas, edema cerebral, hidrocefalias graves, traumatismo cervical e síndrome de Chiari, situações em que está contraindicada a realização de punções (Wamsley & Alleman, 2004; Di Terlizzi & Platt, 2009).

Em casos de suspeita de instabilidade vertebral cervical e de luxação atlanto-axial a colheita de LCR não está indicada, assim como em doentes com coagulopatias (Wamsley & Alleman, 2004; Di Terlizzi & Platt, 2009).

8.5 - Consequências/complicações

Todos os procedimentos médicos têm um risco associado, e as punções cerebelomedular e lombar não são excepções. A inserção de agulha e colheita de LCR podem provocar um gradiente de pressão suficiente para que ocorra movimentação caudal de estruturas intracranianas, ou seja hérnia. Hérnia cerebelar pode comprimir estruturas como a medula

oblonga e centros vitais do tronco cerebral, provocando graves depressões respiratórias, coma e, por vezes morte (Chrismas, 1991; Luján Feliu-Pascual et al., 2008; Di Terlizzi & Platt, 2009).

Já foram descritos casos de meningites como consequência de má assépsia ou de contaminação da agulha antes da colheita (Bradley et al., 2004).

Caso a agulha não se mantenha no plano correcto de inserção, um vaso do seio venoso vertebral pode ser perfurado, resultando no aparecimento de sangue na agulha. Geralmente não ocorrem efeitos secundários nos animais e, visto que estes seios estão fora da medula espinhal, o LCR estará livre de contaminação sanguínea iatrogénica (Braund, 1986). No entanto, pode acontecer que durante a picada apareça um fina linha de sangue na agulha resultante dos vasos da pia-aracnóide. Esse sangue por vezes pode não interferir na análise do LCR, principalmente se o líquido fluir e limpar a agulha espontaneamente (Braund, 1986; Gomes et al., 2009).

Sinais como inclinação da cabeça e hemiparésia podem ocorrer devido a lesão de núcleos vestibulares e de feixes motores descendentes na parte ventral do QV. Embora possam ocorrer, estes sinais geralmente não são permanentes, sendo transitórios entre um a sete dias (Chrismas, 1991). Porém, casos de tetraparésia não-ambulatória e seringo hidromielia permanentes pós-punção já foram descritos, resultando na realização de eutanásia dos doentes (Parent, 1999; Luján Feliu-Pascual et al., 2008).

9 - O LCR no animal saudável - características e técnicas laboratoriais

A análise de rotina do LCR deve incluir: avaliação física e macroscópica, contagem de células, determinação do teor proteico e avaliação citológica (Coles, 1979; Freeman, 2005). Se o volume de LCR é limitado, a contagem total e diferencial de células deve ser a prioridade (Parent, 1999).

9.1 - Avaliação física e macroscópica

9.1.1 - Coloração

O LCR normal é incolor, com uma aparência semelhante a água, e geralmente qualquer coloração no LCR representa uma alteração (Ducoté & Dewey, 2008; Di Terlizzi & Platt, 2009; Nghiem & Schatzberg, 2010).

9.1.2 - Turvação

Como mencionado, o LCR tem uma aparência aquosa e o seu aspecto normal é translúcido e transparente (Wamsley & Alleman, 2004; Di Terlizzi & Platt, 2009).

9.2 - Análises qualitativas

9.2.1 - Proteína total

Comparado com o plasma sanguíneo, o LCR tem uma concentração proteica extremamente baixa, com apenas cerca de 0,5% da concentração de proteína total ([PT]) do sangue (Fishman, Ransohoff & Osserman, 1958; Aldred, Brack & Schreiber, 1995; Di Terlizzi & Platt, 2009; Nghiem & Schatzberg, 2010).

Tal como no Homem, nos cães a [PT] aumenta ao longo do neuro-eixo, no sentido rostro-caudal. É por essa razão que em amostras obtidas na cisterna atlanto-occipital se verificam valores de [PT] inferiores do que nas colhidas por punção lombar (Bailey & Higgins, 1985; Thomson et al., 1990; Wamsley & Alleman, 2004; Nghiem & Schatzberg, 2010). Em colheitas na cisterna magna os valores considerados normais para a [PT] são entre 15 a 25 miligramas por decilitro (mg/dl) (ou menor do que 25 mg/dL), enquanto que nas amostras da cisterna lombar os valores variam entre 20 a 45 mg/dL (ou menor que 45 mg/dL) (Fishman et al., 1958; Nghiem & Schatzberg, 2010). Pensa-se que é devido à lenta circulação de LCR na região lombar, com a conseqüente acumulação de proteína, embora outros estudos defendam dever-se ao aumento da permeabilidade da BSLCR às proteínas nessa região (Fishman et al., 1958; Thomson et al., 1990; Di Terlizzi & Platt, 2009).

Praticamente a totalidade das proteínas do LCR são originárias do plasma sanguíneo, sendo a albumina o constituinte maioritário (cerca de 80 a 95%) (Aldred et al., 1995; Reiber & Peter, 2001; Reiber, 2003; Freeman, 2005; Di Terlizzi & Platt, 2009). Existem também vestígios de outras proteínas sintetizadas pelos PC, como por exemplo a transtirretina, a transferrina e a proteína de ligação ao retinol, a alfa-macroglobulina, beta e gama-globulinas, a prostaglandina D, entre outras (Aldred et al., 1995; Forterre, Raila, Forterre, Brunberg & Schweigert, 2006; Di Terlizzi & Platt, 2009).

Como os métodos quantitativos de determinação proteica no LCR não estão sempre rapidamente disponíveis, existem técnicas semi-quantitativas rápidas e acessíveis na prática clínica diária, sem ser necessário equipamentos dispendiosos (Jacobs, Cochrane, Lumsden & Norris, 1990; Freeman, 2005). De todas as proteínas mencionadas, as globulinas compõem a fracção proteica mais importante a medir. A técnica mais simples de aferir a presença de globulinas no LCR é o método de Pandy (Coles, 1979; Meyer, Coles & Rich, 1992; Rakich & Latimer, 2003).

Este teste consiste na mistura de LCR com fenol. Num pequeno tubo de ensaio com cerca de 1 ml do reagente de Pandy⁸ adicionam-se duas a três gotas de LCR. Se nessa amostra de LCR estiver presente uma concentração de globulinas superior ao normal, a reacção irá resultar no aparecimento de filamentos ou estruturas floculares brancas. O resultado é dado numa escala de 0 a 4+ de acordo com a abundância dos produtos floculares que resultam

⁸ O reagente de Pandy consiste em 10g de ácido carbólico cristalizado em 100 ml de água destilada (Coles, 1979; Desnoyers et al., 2008).

da reacção, sendo o 0 a normalidade (sem reacção) e o 4+ uma reacção exuberante, com uma elevada concentração de globulinas, sendo que este teste tem uma sensibilidade de aproximadamente 50 mg/dL (Coles, 1979; Meyer et al., 1992; Rakich & Latimer, 2003; Desnoyers et al., 2008). É importante não esquecer que caso a amostra de LCR tiver sido contaminada com sangue durante a punção este teste pode não ser fiável, visto que as globulinas do sangue resultam em falsa positividade (Coles, 1979). No entanto, tendo em conta a natureza semi-quantitativa, a não reprodutividade dos resultados e a limitação na detecção de aumentos ligeiros na [PT], tem sido sugerido outro método de deteção, nomeadamente o uso das tiras de análise de urina (*urinary dipstick*) (Jacobs et al., 1990; Meyer et al., 1992; Rakich & Latimer, 2003; Freeman, 2005; Desnoyers et al., 2008; Marcos & Santos, 2011). A tabela 3 ajuda na interpretação das tiras de urina e os resultados da [PT] estimada.

Decisões clínicas que se baseiam em leituras com resultados iguais ou superiores a "++" são altamente confiáveis. Porém, as tiras de urina apenas têm aplicação como teste de triagem, compreendendo que resultados falsos negativos e falsos positivos podem ocorrer quando os valores são vestigiais ou 1+ (Jacobs et al., 1990; Rakich & Latimer, 2003; Di Terlizzi & Platt, 2009). Assim, esta estimativa deve ser seguida de análises quantitativas em laboratórios de referência (Parent, 1999; Di Terlizzi & Platt, 2009).

Tabela 3 - Estimativa da [PT] do LCR através da utilização de *urinary dipsticks* (N-Multitix SG, Bayer, Miles, Diagnostic Division). Para a elaboração desta tabela foram recolhidos dados dos seguintes autores: Villiers & Blackwood, 2005 e Peleteiro, Marcos, Santos, Correia, Pissarra & Carvalho, 2011.

Resultado da <i>urinary dipstick</i>	[PT] estimada	Interpretação
Negativo	< 30 mg/dL	Dentro dos valores normais
Vestígios (" <i>traces</i> ")		
+	30 mg/dL	Anormal
++	100 mg/dL	
+++	300 mg/dL	
++++	> 2000 mg/dL	

9.3 - Contagem de células

O número total de células observadas e a caracterização das mesmas são ferramentas de extrema importância na análise correcta do LCR para o diagnóstico de afecções do SNC (Desnoyers et al., 2008; Di Terlizzi & Platt, 2009).

9.3.1 - Contagem total de células (CTC)

A CTC é realizada com o auxílio de hemocitómetros, visto que as técnicas hematológicas não são suficientes para a detecção de células no LCR devido à baixa concentração celular

do LCR saudável e, por vezes, até do LCR do animal doente. Câmaras como as de Neubauer, Nageotte ou de Fuchs-Rosenthal são utilizadas, após permanecerem durante 10 a 15 minutos num ambiente húmido facilitando a adesão das células ao vidro (Boogerd, et al., 1988; Moroff, Eich & Dabay, 1994; Abate, Bollo, Lotti & Bo, 1998; Desnoyers et al., 2008; Di Terlizzi & Platt, 2009). A contagem é feita após o enchimento de ambas as câmaras do hemocitómetro com LCR não diluído (Wamsley & Alleman, 2004).

Os eritrócitos e as células nucleadas são contadas separadamente (Di Terlizzi & Platt, 2009). A CTC nucleadas em animais saudáveis é inferior ou igual a cinco células por microlitro (cél/μL) e tipicamente não existem eritrócitos (excepto se ocorrer contaminação durante a colheita) (Wamsley & Alleman, 2004; Ducoté & Dewey, 2008).

Deve-se ter cuidado especial na diferenciação entre eritrócitos e leucócitos. Os eritrócitos são pequenos, bicôncavos, alaranjados, bastante translúcidos e podem ser crenados. Os leucócitos, por outro lado, são maiores, por vezes granulares, acinzentados e muito menos translúcidos em comparação com os eritrócitos. Porém, leucócitos pequenos podem ser facilmente confundidos com eritrócitos, resultando em CTCs erradas (Wamsley & Alleman, 2004; Desnoyers et al., 2008).

Um método simples de diferenciação celular neste tipo de contagem é a técnica do Azul de Metileno, descrita por Fry e seus colaboradores (2006). Ao adicionar-se este corante na amostra de LCR a analisar, com o auxílio de um tubo de microhematócrito, garante-se que as células nucleadas sejam coradas facilitando a distinção entre estas e os eritrócitos (Fry, Vernau, Kass & Vernau, 2006; Marcos & Santos, 2011; Wood et al., 2012).

Amostras colhidas por punção lombar a cães saudáveis apresentam contagens celulares inferiores do que as colhidas na cisterna magna (Ducoté & Dewey, 2008).

9.3.2 - Contagem diferencial de leucócitos (CDLs) e Citodiagnóstico (CDx)

Devido à baixa celularidade que o LCR geralmente apresenta, é necessário recorrer-se a técnicas de concentração para possibilitar a avaliação citológica (Desnoyers et al., 2008; Taylor, 2009). Porém, o contrário também se verifica, ou seja, um dos factores determinantes para a contagem diferencial de monócitos, linfócitos e qualquer outro tipo de célula presente⁹ no LCR é um elevado número total de células (Lehmitz, 1988).

As técnicas mais comumente utilizadas são as câmaras de sedimentação e a citocentrifugação. Ambos os processos se baseiam em princípios físicos em que as células, devido às forças gravitacionais ou centrífugas, se depositam numa lâmina de vidro, que posteriormente será fixada e corada (Komp, 1972; Německová, 1991; Cellio, 2001). Contudo, após uma observação detalhada, a preservação celular (citomorfologia) é maior

⁹ É importante ter em mente que no LCR, seja de animais saudáveis ou com afecções neurológicas centrais, outros tipos de células, como células ependimais, do plexo coróide, meningeais ou, muito raramente, até mesmo neurónios, podem estar presentes. Desse modo, em vez do termo "Contagem Diferencial de Leucócitos", será mais correcto aplicar-se a designação de Citodiagnóstico (Kolmer, Spaulding & Robinson, 1952).

com métodos menos agressivos, como as técnicas de sedimentação (Dyken, Shirley, Trefz & El Gammal, 1980).

A sedimentação é o procedimento recomendado na ausência de citocentrífugas e que facilmente pode ser realizado no consultório pelo próprio MV ou outro profissional treinado para tal (Taylor, 2009).

Esta técnica é vantajosa na medida que é moderadamente rápida e proporciona um rendimento celular de aproximadamente 60%, sendo que a distribuição da contagem celular reflete a verdadeira distribuição na amostra (Cellio, 2001; Taylor, 2009).

As desvantagens desta metodologia consistem na perda de pequenas células e na possível activação de células mononucleares, o que pode resultar num aumento das dimensões celulares, vacuolização e aumento da actividade fagocítica (Cellio, 2001; Dyken et al., 1980).

As câmaras de sedimentação devem ser preparadas previamente à colheita de LCR. Um tubo de centrífuga cortado a meio, ou a extremidade lisa do corpo de uma seringa de 5 mL, é posicionado e colado perpendicularmente à lâmina de vidro através de vaselina. Apenas é necessário um volume de 0,5 mL de LCR, que deverá repousar aproximadamente 30 minutos, dando tempo às células para sedimentarem e aderirem à lâmina de vidro. Após esse intervalo de tempo o sobrenadante é retirado com o auxílio de uma agulha e uma seringa, a parafina é cortada e o tubo retirado, possibilitando que a lâmina seja, então, fixada e corada (Cellio, 2001; Taylor, 2009).

A citocentrifugação é a técnica mais usada por laboratórios especializados. O factor que condiciona a sua utilização na prática clínica diária é o dispendioso equipamento (Komp, 1972; Kontopolous, Minns, O'Hare & Eden, 1986; Německová, 1991; Cellio, 2001).

A citocentrifugação do LCR é vantajosa na medida em que (1) é simples e fornece resultados rápidos, preservando razoavelmente a citomorfologia; (2) as células apresentam-se bem espalhadas facilitando a distinção e correcta avaliação da morfologia citoplasmática e nuclear das células; (3) por um lado, utiliza um maior volume de LCR do que o hemocítmetro, minimizando a possibilidade de a amostra ser classificada como acelular e (4) por outro lado, comparada com técnicas de sedimentação, são necessárias aliquotas muito pequenas, obtendo-se resultados com volumes de, aproximadamente, 0,2 ml (Yamashita et al., 1979; Whitmore, Hochberg, Wolfson, Royalty & Taft, 1982; Cellio, 2001).

A amostra de LCR é centrifugada directamente para uma lâmina de vidro num ciclo de cerca de 500 a 1000 rotações/minuto, durante 5 minutos. O sobrenadante é removido, a lâmina é fixada e corada, sendo a contagem feita, posteriormente, com o auxílio de um microscópio. É recomendável que sejam obtidas pelo menos duas lâminas por análise (Komp, 1972; Cellio, 2001; Taylor, 2009).

No entanto, ter um espírito crítico na interpretação de contagens celulares é essencial. De acordo com o estudo de Christopher e seus colaboradores (1988) com a aplicação da citocentrifugação, aproximadamente um quarto das 145 amostras de LCR canino com CTCs

normais apresentaram alterações morfológicas nas células. Esses resultados alertam para o facto de que CTCs dentro dos valores aceitáveis, nem sempre devem ser consideradas como normais sem antes terem sido avaliadas as características morfológicas das células presentes na amostra (Christopher, Perman & Hardy, 1988). Para além disso, existe a possibilidade de se observar um aumento na vacuolização celular e destruição de alguns leucócitos secundariamente à centrifugação (Cutler & Spertell, 1982; Cellio, 2001). Desde a década de 80 do século passado que as técnicas de citocentrifugação têm vindo a ser aprimoradas, aperfeiçoando o diagnóstico de afecções neurológicas, minimizando assim as alterações celulares mencionadas (Christopher et al., 1988; Německová, 1991).

Fixar e corar as lâminas são procedimentos essenciais para a CDLs e CDx. A utilização de um corante que confira uma coloração escura ao fundo do campo óptico dificulta a observação e avaliação celular. Desse modo, a escolha do corante é importante. Vários tipos de corantes e técnicas podem ser utilizadas, como Romanowsky (Diff-Quick, May-Grunwald-Geimsa, Wright's, Geimsa ou combinações) ou colorações multicolores como a Papanicolau (Boogerd et al., 1988; Vernau, 2000; Freeman, 2005; Marcos & Santos, 2011). A percentagem de linfócitos, plasmócitos, monócitos, macrófagos, neutrófilos e eosinófilos é contada, assim como a sua classificação de acordo com a dimensão e aparência e taxa de mitose. A distribuição celular normal deve ser predominantemente mononuclear com a presença ocasional de neutrófilos (Vernau, 2000; Ducoté & Dewey, 2008). Mais especificamente, as células presentes num LCR de um animal saudável são, na maioria, pequenos linfócitos e células monocitóides. A presença de neutrófilos até 20% do número total de células nucleadas é considerado normal. Eosinófilos podem ser encontrados ocasionalmente em pequeno número (Freeman, 2005; Marcos & Santos, 2011).

10 - Processamento da amostra

O LCR é extremamente lábil e o correcto processamento e manipulação das amostras garantem a preservação da morfologia celular (Cutler & Spertell, 1982). Isso implica que a análise seja feita rapidamente após a sua colheita de modo a evitar resultados duvidosos. Embora se desconheça qual o intervalo de tempo aceitável para se analisar o LCR com confiança, é comumente aceite que se deve analisá-lo até 30 a 60 minutos após a sua obtenção (Fry et al., 2006; Desnoyers et al., 2008; Dimas & Puccioni-Sohler, 2008; Di Terlizzi & Platt, 2009; Taylor, 2009).

Poucos são os MV que analisam o LCR imediatamente após a colheita nas suas instalações, remetendo as amostras para laboratórios especializados. Com isso, o tempo médio entre a colheita e a análise do LCR pode atingir várias horas, o que potencialmente acarreta implicações clínicas significativas (Steele, Marmer, O'Brien, Tyson & Steele, 1986; Glantz et al., 1998; Bienzle, McDonnell & Stanton, 2000; Fry et al., 2006).

O baixo teor proteico e lipídico do LCR normal são dois factores limitantes na preservação deste, devido à instabilidade das membranas celulares em fluidos hipotónicos (Steele et al., 1986; Glantz et al., 1998).

Assim sendo, o LCR deve ser recolhido para pequenos reservatórios estéreis, dividindo-se pelo menos duas aliquotas: 1) uma para determinação da [PT] e contagem de células nas instalações e 2) outra, onde se adicione, preferencialmente, um agente estabilizante, para possíveis estudos futuros. Porém, é improvável que ocorram erros interpretativos na análise citológica do LCR caso a [PT] da amostra seja igual ou superior a 50 mg/dL. Se a análise não for realizada na primeira hora pós-colheita, o LCR pode ser refrigerado de modo a garantir uma lenta degradação celular, mantendo-se estável por 4 a 8 horas, não tendo efeitos nefastos sobre outros componentes como proteínas e glicose (Wamsley & Alleman, 2004; Fry et al., 2006; Rosato, Gama & Santana, 2006; Desnoyers et al., 2008; Di Terlizzi & Platt, 2009; Taylor, 2009; Nghiem & Schatzberg, 2010).

Existem alguns agentes estabilizantes que podem ser adicionados às amostras de modo a prolongar o tempo-útil das aliquotas. Soro autólogo, soro fetal de vitelo (FCS), formalina tamponada a 10% e hetamido são exemplos de estabilizantes/preservantes. No entanto, as características dos agentes utilizados e as suas respectivas diluições devem ser levadas em atenção para os cálculos dos resultados. No caso de soro, seja autólogo ou FCS, o teor proteico estará aumentado devido às proteínas séricas, e no caso do hetamido a diluição afecta a CTC, de modo que qualquer determinação desses constituintes deve ser feita previamente à adição do estabilizante ou então devem aplicar-se factores de correcção nas análises futuras¹⁰. Para que a utilização da formalina seja eficaz é necessário adicionar uma gota por cada 0,25 mL de LCR; o hetamido deve estar numa proporção de um para um (1:1), o FCS deve estar numa concentração de 20% (volume:volume) ou utilizar-se soro-autólogo a 10% (volume:volume) (Bienzle et al., 2000; Fry et al., 2006; Desnoyers et al., 2008; Taylor, 2009).

11 - O LCR no animal doente - características e técnicas laboratoriais

11.1 - Avaliação física e macroscópica

O aspecto físico e a análise macroscópica do LCR muitas vezes fornecem informações que podem ajudar a direccionar o raciocínio clínico e orientar os futuros procedimentos e análises no LCR (Desnoyers et al., 2008). A colheita e posteriores exames ao LCR devem ser realizados nas fases agudas de modo a evitar resultados falsos negativos (Greene & Oliver, 1983).

¹⁰ O soro autólogo deve ser adicionado na concentração de 10% e o FCS na de 20% (Fry et al., 2006).

11.1.1 - Coloração

Qualquer alteração na cor do LCR é sinal da perda do estado hígido do paciente (Di Terlizzi & Platt, 2009).

LCR com cor vermelha ou rosa sugerem presença de sangue (Di Terlizzi & Platt, 2009; Nghiem & Schatzberg, 2010). Nestas situações é de extrema importância distinguir-se hemorragias iatrogénicas (devido à técnica de punção) de hemorragias patológicas. Para tal efeito deve-se centrifugar a amostra. Se após o ciclo de centrifugação surgir um sobrenadante incolor sobre um sedimento celular vermelho, então a alteração na coloração da amostra é consequência da presença de eritrócitos intactos resultantes de: contaminação iatrogénica com sangue periférico ou hemorragia no espaço subaracnóide recente (poucas horas) (Di Terlizzi & Platt, 2009; Nghiem & Schatzberg, 2010). Se, por outro lado, a cor vermelha ou amarelada persistir isso é indicativo de hemorragia crónica (Wamsley & Alleman, 2004; Nghiem & Schatzberg, 2010). Outro método de distinção é a realização de um esfregaço do líquido onde podem ser visíveis plaquetas, estando contudo a eritrofagocitose ausente caso seja uma hemorragia iatrogénica (Rakich & Latimer, 2003).

Xantocromia (ou coloração amarela/alaranjada do LCR) implica a presença de bilirrubina. Como mencionado anteriormente, se o LCR é xantocrómico pode ser indicativo de hemorragia crónica (ou uma hemorragia que tenha ocorrido até 10h antes da colheita). Os eritrócitos, devido a hemorragia, entram em circulação no LCR e são metabolizados, resultando na formação de bilirrubina. Esta coloração pode persistir por duas a quatro semanas, mas geralmente a normalidade é alcançada entre quatro a oito dias (Wamsley & Alleman, 2004; Ducoté & Dewey, 2008; Nghiem & Schatzberg, 2010). Muito menos comum é a presença de bilirrubina conjugada no LCR devido à sua grande concentração sérica em algumas afecções onde se observe também um grave estado ictérico. Caso as BHE/BSLCR não se encontrem intactas, tanto a bilirrubina conjugada como a não-conjugada podem atingir o LCR (Wamsley & Alleman, 2004; Ducoté & Dewey, 2008; Lorenz & Coates, 2011). Esta coloração também pode ocorrer com o aumento da [PT] e em casos de inflamações ou neoplasias do SNC (Di Terlizzi & Platt, 2009; Nghiem & Schatzberg, 2010).

Outras colorações descritas, mas que muito raramente ocorrem, são a amarelo/esverdeada e a cinzento/preto. O LCR pode apresentar-se amarelo/esverdeado devido a uma grande elevação na concentração de células nucleadas que pode ser observada em inflamações purulentas ou neoplasias (Wamsley & Alleman, 2004). Se grânulos de melanina, ou até mesmo melanócitos, estiverem presentes no LCR, este pode adquirir uma coloração acinzentada a negra (Seehusen, Reeves & Fomin, 2003; Wamsley & Alleman, 2004; Kim, Royal, & Villamil, 2009). A tabela 4 resume, esquematicamente, as diferentes colorações que são possíveis de se observar no LCR.

Tabela 4 - Colorações do LCR e sua etiologia (Adaptada de Wamsley & Alleman, 2004).

Cor	Vermelho	Amarelo/Laranja (Xantocromia)	Amarelo/Verde	Cinzento/Preto
Significado	Hemorragia iatrogénica (punção) Hemorragia patológica	Bilirrubina associada com hemorragia patológica Hiperbilirrubinémia	Aumento da concentração de células nucleadas (inflamações purulentas; neoplasias)	Presença de melanócitos ou de grânulos de melanina

11.1.2 - Turvação

Sempre que o LCR não se encontre transparente é considerado alterado. Qualquer aumento na turvação é atribuído a partículas no fluido e tipicamente ao aumento da celularidade do LCR (Rakich & Latimer, 2003; Desnoyers et al., 2008; Di Terlizzi & Platt, 2009; Nghiem & Schatzberg, 2010). Contagens celulares superiores a 500 cél/ μ L são responsáveis pela perda do aspecto transparente do LCR¹¹ (Rakich & Latimer, 2003; Lorenz & Coates, 2011). Também é descrito que elevações marcadas da [PT] e a presença de bactérias e fungos estão associadas ao aumento da viscosidade e turvação do LCR (Rakich & Latimer, 2003; Nghiem & Schatzberg, 2010). Erros técnicos, como aspiração de gordura, podem provocar alterações da turvação do LCR (Rakich & Latimer, 2003).

11.1.3 - Coagulação

O LCR é fluido, porém a sua viscosidade pode aumentar e, embora seja muito raro, esse aumento pode ser suficiente para ocorrer a coagulação do LCR. Isso por vezes está associado a um grande aumento da proteína total, fibrinogénio por reacção das meninges, entre outros (Coles, 1979; Ducoté & Dewey, 2008).

11.2 - Análises qualitativas

11.2.1 - Proteína

Em afecções neurológicas o aumento da [PT] ocorre devido à perda da integridade da BHE e BSLCR, com consequente transsudação de proteínas sanguíneas para o LCR proporcionalmente à concentração sérica e ao peso molecular ou devido à produção de globulinas intratecais (Sorjonen, 1987; Johnson, 2001; Rakich & Latimer, 2003). Após a realização dos testes rápidos para determinação qualitativa da [PT], descritos previamente, surge a necessidade de quantificar com precisão os aumentos na concentração proteica do LCR (Parent, 1999; Di Terlizzi & Platt, 2009).

¹¹ Ducoté e Dewey (2008) depreendem que o LCR perde seu aspecto translúcido com aumentos na celularidade em contagens superiores a 200 linfócitos/ μ L e/ou a 400 eritrócitos/ μ L.

11.2.1.1 - Proteína total

Para a quantificação de [PT] do LCR assume-se que: (1) todas as moléculas proteicas são cadeias polipéptidas puras com 16% de azoto na sua composição molecular e (2) que das centenas de proteínas existentes, todas reagem quimicamente do mesmo modo. Obviamente, a primeira premissa é falsa e a segunda nem sempre se verifica. Não obstante, essas suposições simplistas tornam o doseamento e a quantificação de proteínas em fluidos biológicos práticos, embora empíricos (Johnson, 2001).

Existem várias técnicas moleculares ao dispor de laboratórios de referência, sendo que os mais comumente utilizados são as técnicas electroforéticas e espectrofotométricas (Johnson, 2001; Taylor, 2009).

As mesmas técnicas de electroforese que se utilizam na quantificação de proteína total sérica podem ser aplicadas ao LCR, caso se disponha de volumes suficientes. Porém, é aconselhável o recurso a métodos de alta-resolução tais como o uso de electroforese por imunofixação e coloração por prata, que aumentam a sensibilidade do teste, 10 a 100 vezes, assim como permitem a análise de amostras não concentradas (Symons & Brown, 2000; Johnson, 2001; Karcher & Landers, 2001; Alberts et al., 2002; Rakich & Latimer, 2003; Walker, 2005).

As técnicas espectrofotométricas mais utilizadas são as que recorrem a corantes, baseando-se na capacidade das proteínas de estabelecer ligações químicas a essas substâncias (Meyer et al., 1992; Johnson, 2001). Os corantes utilizados na esmagadora maioria dos testes são os membros pertencentes à série de Azul Brilhante de Coomassie e o Vermelho Pyrogallol (Johnson & Lott, 1978; Heick, Bégin-Heick, Acharya & Mohammed, 1980; Fujita, Mori & Kitano, 1983; Mohammadi et al., 1989; Johnson, 2001; Alberts et al., 2002; Desnoyers et al., 2008). Após a marcação das proteínas, a quantificação é feita no espectrofotómetro, de acordo com a intensidade da luz no comprimento de onda seleccionado, sendo directamente proporcional com a [PT] da amostra. Ou seja, quanto mais intensa a cor obtida, maior será a concentração proteica (Johnson, 2001; Karcher & Landers, 2001; Kricka & Park, 2001). Testes como este são fornecidos em *kits* por diversos laboratórios, denominados de "*Kits* de microproteína para determinação de proteínas na urina e no LCR" (Beckman Coulter, Inc., 2010).

Recentemente, testes ELISA para detecção de microalbumina foram validados para amostras de urina e de LCR de cães e gatos (Gentilini et al., 2005). Estes *kits* de detecção de microalbumina são considerados testes de alta qualidade e especificidade na determinação da concentração de albumina na urina e no LCR (Lyon et al., 2010). A quantificação também é feita através de espectrofotometria, porém, neste caso, a concentração proteica da amostra é inversamente proporcional à absorvância (Thorpe & Thorpe, 2005).

11.2.1.1.1 - Dissociação albuminocitológica

Ao aumento da [PT] com CTC normais chama-se de dissociação albuminocitológica. Este fenómeno ocorre devido a diversas afecções do SNC que lesionam a BHE/BSLCR, que aumentam a síntese de proteínas pelo SNC e/ou que obstruem o fluxo do LCR (Wamsley & Alleman, 2004).

Seja devido a lesões compressivas extradurais (afecções dos discos intervertebrais, mielopatia cervical estenótica, quistos medulares sinoviais, neoplasias, entre outras) ou como consequências de alterações intramedulares (neoplasias, seringohidromielia, mielopatias degenerativas, necrose isquémica devido a tromboembolismos fibrocartilagíneos, traumatismos, vasculite), desde que haja lesões das barreiras do SNC, interrupções do fluxo/absorção de LCR ou produção intratecal de globulinas, este fenómeno pode verificar-se (Rakich & Latimer, 2003; Wamsley & Alleman, 2004; Freeman, 2005).

11.2.1.1.2 - Albumina e Quociente de albumina

Como mencionado anteriormente, a albumina, produzida pelo fígado, representa cerca de 80-95% do teor proteico do LCR. No animal saudável a concentração de albumina no LCR é sempre inferior à concentração sérica e o rácio entre albumina do LCR e do sangue é mantido constante (Sorjonen, 1987; Di Terlizzi & Platt, 2009). Deste modo, um aumento na concentração de albumina no LCR e consequentes elevações do rácio de albumina sérica e do LCR são indicadores de lesão das BHE e BSLCR (Sorjonen, 1978; Sorjonen, Cox & Swango, 1989; Gentilini et al., 2005).

O rácio entre a albumina do LCR (LCR.alb) e a albumina sanguínea (S.alb) é denominado de quociente de albumina (QA)¹² e é considerado normal se for inferior a 2,35 (Sorjonen, 1987; Di Terlizzi & Platt, 2009).

Semelhantes aos *kits* de microproteína mencionados em 11.2.1.1, existem *kits* para a determinação de microalbumina em amostras de urina e LCR (Hutchison & Paterson, 1988; McCormick, Shihabi & Konen, 1989; Toto, 2004). Estes testes imunoturbidimétricos baseiam-se em reacções com complexo antigénio-anticorpo, com anticorpos anti-albumina presente na amostra, sendo a quantificação realizada através de espectrofotometria (Johnson, 2001; DiaSys Diagnostic Systems GmbH, 2008).

11.2.1.1.3 - Enzimas

Existem três possíveis origens para as enzimas alcançarem o LCR: (1) o sangue, (2) as células presentes no LCR e (3) o tecido ou tumores do SNC. Tem sido extremamente útil investigar a actividade de algumas enzimas no LCR para a determinação do diagnóstico e prognóstico no decorrer de afecções do SNC (Bailey & Vernau, 1997; Rosato, Gama & Santana, 2006).

¹² QA = LCR.alb (mg=dL) / S.alb (g=L).

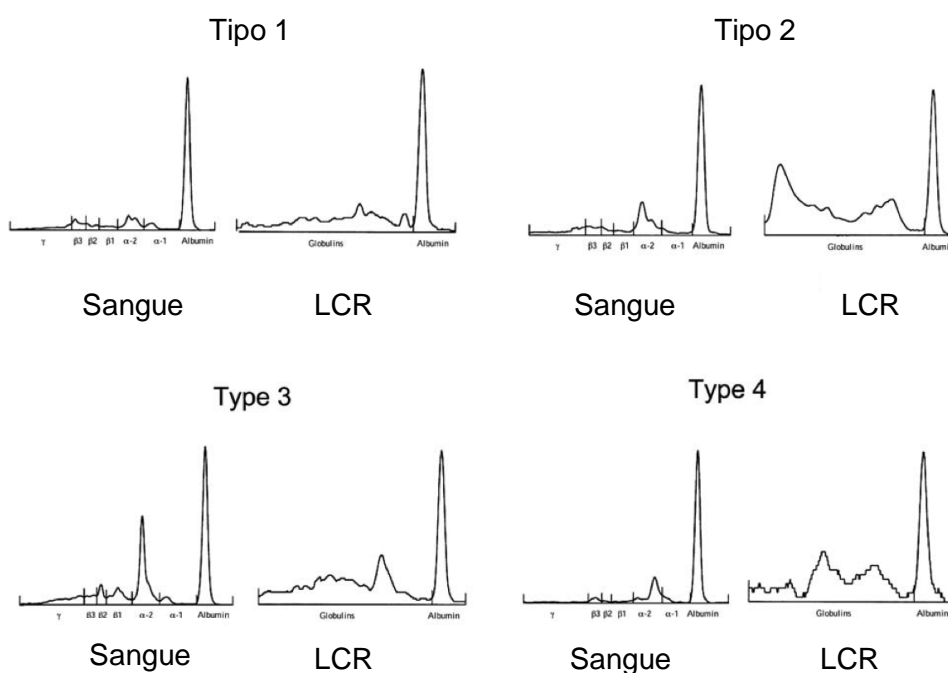
Enzimas como a creatina kinase (CK) e a aspartato-aminotransferase (AST), entre outras, são proteínas de grandes dimensões que num animal saudável não ultrapassam as BHE/BSLCR. Assim sendo, um aumento das actividades enzimáticas destas no LCR têm sido consideradas como indicadores de lesão e necrose do SN, visto não ocorrerem em simultâneo no sangue (Chrisman, 1985; Cook & DeNicola, 1988; Feldman, 1997; Thrall, 2004; Nazifi, Karimi, Hosseini nezhad, Hosseini & Esmailnezhad, 2006; Jaggy, 2010). Adicionalmente, o prognóstico é considerado reservado quando se observam actividades elevadas da AST e CK (Indrieri, Holliday & Keen, 1980; Feldman, 1997; Rosato et al., 2006).

11.2.1.4 - Globulinas e Imunoglobulinas

As globulinas dividem-se em várias fracções, sendo que a que tem maior significância nas afecções neurológicas é a fracção das gama-globulinas (γ -globulinas). Nesta classe incluem-se as imunoglobulinas (Ig), a saber a IgG, IgM e IgA (as principais Ig presentes no LCR) (Sorjonen, 1987; Sorjonen, Cox & Swango, 1989; Bailey & Vernau, 1997). O seu doseamento, através de técnicas electroforéticas, acresce importantes informações para o diagnóstico, não sendo alteradas pela corticoterapia (Cohn, 1997; Cizinauskas, Jaggy & Tipold, 2000; Behr, Trumel, Cauzinille, Palenché & Braun, 2006).

11.2.1.4.1 - Perfis electroforéticos da proteína no LCR.

Figura 5 - Perfis electroforéticos proteicos no LCR. Adaptado de Behr et al., 2006. Estes perfis ilustram quatro situações que se podem encontrar aquando da realização da quantificação proteica por electroforese. O tipo 1 é o perfil de um animal saudável. O tipo 2 mostra um pico das globulinas no LCR, mas não no sangue, simulando a produção intratecal de Ig. O tipo 3 representa perfis anormais, tanto no LCR como no sangue, sugestivo de alterações das BHE/BSLCR num doente com uma afecção do SNC. O tipo 4 ilustra um perfil que não deve ser interpretado porque o LCR tem concentrações proteicas inferiores a 20 mg/dL e apresentam perfis de integração distorcidos (Behr et al., 2006).



11.2.1.4.2 - IgG

A IgG é a imunoglobulina com maiores dimensões que se pode encontrar, em pequenas concentrações, no LCR de animais saudáveis, tendo geralmente origem no plasma sanguíneo. Na presença de afecções do SNC as concentrações desta Ig podem aumentar no LCR, seja por extravasamento sérico, seja por produção intratecal. Visto que os aumentos no LCR são acompanhados de elevações no plasma sanguíneo, o rácio entre ambas as concentrações será de maior utilidade do que os seus valores absolutos, determinando-se se esse aumento é consequência de actividade do saco tecal (Tipold, Pfister & Vandeveld, 1993; Tipold, Pfister, Zurbriggen & Vandeveld, 1994; Jones, Cartee & Bartels, 1995; Di Terlizzi & Platt, 2009).

O índice-IgG (do inglês: *IgG index*)¹³ é um valor que reflecte com precisão a produção intratecal de IgG no SNC. O índice-IgG é considerado normal se o seu valor for inferior a 0,27, com um QA normal (Tipold et al., 1993; Behr et al., 2006; Di Terlizzi & Platt, 2009).

Com a excepção da forma nervosa da esgana, em quase todos os cães que padecem de afecções inflamatórias infecciosas do SNC existe um aumento da produção intratecal da IgG, com conseqüente aumento do índice-IgG. Doenças degenerativas, compressões medulares ou alterações isquémicas podem apresentar níveis de IgG normais ou ligeiramente aumentados, tal como a grande maioria das neoplasias do SNC que apresentam concentrações normais desta Ig (Bichsel, Vandeveld, Vandeveld, Affolter & Pfister, 1984; Tipold et al., 1993; Tipold, 1995).

11.2.1.4.3 - IgM

A presença de IgM no LCR não é considerada normal. A sua detecção ocorre nos primeiros estadios da resposta humoral, sendo também a primeira das imunoglobulinas a normalizar a sua concentração na ausência do estímulo inflamatório. Deste modo, é óbvio que este parâmetro tem uma maior especificidade para se poder afirmar a existência de afecções inflamatórias infecciosas do que a IgG, caso ocorra um aumento na sua concentração no LCR (Di Terlizzi & Platt, 2009).

11.2.1.4.4 - IgA

A IgA, uma imunoglobulina envolvida nas primeiras linhas de defesa do organismo, nas mucosas, é encontrada em grandes concentrações no LCR de cães com meningite-arterite responsiva a corticosteróides (MARC). Embora possam ocorrer aumentos em afecções como esgana ou meningoencefalites granulomatosas, é recomendável a sua medição no LCR quando se suspeita de MARC (Tipold, 1995; Tipold, Vandeveld & Zurbriggen, 1995; Burgener, Van Ham, Jaggy, Vandeveld & Tipold, 1998; Schwartz, Moore & Tipold, 2008; Di Terlizzi & Platt, 2009; Maiolini, Carlson, Schwartz, Gandini & Tipold, 2012).

¹³ O índice-IgG é calculado pela seguinte fórmula [rácio IgG LCR/sangue]: [rácio albumina LCR/sangue] (Eeg-Olofsson, Link & Wigertz, 1981).

11.2.2 - Glicose

A glicose do LCR pode ser rapidamente quantificada na prática clínica diária com o recurso a um glucómetro, embora alguns laboratórios externos façam essa determinação por rotina (Wood et al., 2012).

A concentração de glicose no LCR é dependente de 3 factores: 1) da integridade da BHE, 2) dos níveis de glicose no sangue e 3) da actividade de microorganismos glicolíticos. A informação dada pela concentração de glicose no LCR deve ser sempre comparada com as concentrações sanguíneas. Porém, por mais que a glicose sérica aumente indiscriminadamente, existe uma saturação cinética que controla a concentração deste açúcar no LCR (Fishman, 1964; Spano e Hoerlein, 1978).

Os níveis normais de glicose no LCR devem encontrar-se entre os 60 e os 80% do valor sérico. Aumentos ligeiros podem sugerir compressões medulares, encefalites, abscessos e neoplasias cerebrais. Contudo, alguns tumores são responsáveis por baixos níveis de glicose no LCR (hipoglicorráquia) por diminuição do seu transporte caso haja comprometimento meníngeo (Petersdorf, Garcia & Swarner, 1959; Spano e Hoerlein, 1978; Rosato, Gama & Santana, 2006; Wood et al, 2012).

Outros exemplos de hipoglicorráquia são a esgana canina e a actividade de bactérias glicolíticas responsáveis por infecções piogénicas (meningites bacterianas) (Petersdorf & Harter, 1961; Spano e Hoerlein, 1978; Wood et al., 2012).

11.3 - Contagem de células

O aumento do número de células no LCR designa-se por pleocitose. A pleocitose é caracterizada durante as contagens total e diferencial de células (Wamsley & Alleman, 2004; Taylor, 2009).

11.3.1 - CTC

Grosseiramente, Wood, Garosi e Platt (2012) agrupam os diferentes possíveis diagnósticos diferenciais mais comuns em três diferentes intervalos, tendo em conta os valores obtidos nas CTCs (Tabela 5).

Tabela 5 - Diferentes diagnósticos diferenciais baseados na contagem total de células de amostras de líquido cefalorraquidiano. Adaptada de Wood, Garosi & Platt, 2012.

CTCs	Diagnósticos Diferenciais mais comuns
5 - 25 cél/μL	Vascular, Traumatismo, HD, Convulsões, Neoplasias
25 - 50 cél/μL	Inflamatório, Traumatismo, Neoplasia, HD
> 50 cél/μL	Inflamatório (estéril ou infeccioso), Traumatismo

HD - Hérnias discais.

11.3.2 - CDLs e CDx

Na tabela 5 é óbvia a sobreposição de diversos diagnósticos diferenciais, o que realça a necessidade de recorrer-se ao CDx, com o intuito de alargar o espectro dos possíveis exames complementares que se podem realizar no LCR (Wood et al., 2012). Para além disso, a pleocitose em si não tem correlação com a gravidade da afecção nem com o seu prognóstico. O aumento do número de células no LCR apenas reflete o grau de envolvimento das meninges, ou das células ependimais, durante a doença (Wamsley & Alleman, 2004).

Assim sendo, a CTC e o CDx são úteis quando coadjuvados com a história pregressa, anamnese, o exame neurológico, o conjunto de sinais e outros exames complementares de diagnóstico. Tendo estas limitações em mente, a avaliação das sub-populações linfocíticas pode ser de grande ajuda na caracterização da afecção (Tipold, 2003).

De acordo com o tipo celular predominante, classifica-se os diferentes tipos de pleocitose em mononuclear, neutrofílica, mista ou eosinofílica (Wamsley & Alleman, 2004; Di Terlizzi & Platt, 2009). No entanto, é importante recordar que não só células inflamatórias podem estar presentes no LCR (Kolmer, Spaulding & Robinson, 1952).

11.3.2.1 - Pleocitose mononuclear

A pleocitose mononuclear é caracterizada por um aumento da concentração, ou percentagem (superior a 75%), de linfócitos e/ou de células monocitóides/macrófagos no LCR (Coles, 1986; Di Terlizzi & Platt, 2009; Marcos & Santos, 2011).

Este tipo de pleocitose é característica de infecções virais, podendo ser também observada em infecções protozoárias, em hérnias discais, em mal-formações e instabilidades vertebrais com inflamações consequentes da medula espinhal e neoplasias (Abate et al., 1998; Bohn, Wills, West, Tucker & Bagley, 2006; Garosi et al., 2010).

A MARC, na forma atípica prolongada é caracterizada por uma pleocitose mononuclear e por vezes mista, diferenciando-a da sua forma clínica mais comum com pleocitose neutrofílica (Cizinauskas et al., 2000; Gandini, Brini, Belloti & Cipone, 2003; Kiš, Foršek, Matijatko, Kučer & Šimonji, 2008; Lowrie, Penderis, McLaughlin, Eckersall & Anderson, 2009).

11.3.2.1.1 - Linfócitos

A presença de linfócitos reactivos, médios ou grandes, no LCR, mesmo em contagens normais, pode ser um sinal de compromisso das barreiras protectoras do SNC. Alterações morfológicas associadas a aumentos nas CTCs ocorrem em diversas afecções. Plasmócitos são células que, por vezes, podem ser observadas no LCR em neoplasias e infecções agudas ou em afecções com produção de imunoglobulinas a nível do SNC (Di Terlizzi & Platt, 2009; Marcos & Santos, 2011).

Este tipo de pleocitose (quando mais de 50% das células observadas são linfócitos) é característico, mas não exclusivo, de infecções virais. A esgana canina (*Morbilivirus*) é a infecção viral mais comumente observada no cão e caracterizada por uma pleocitose linfocítica moderada com aumentos ocasionais de macrófagos (Abate et al., 1998; Tipold, 1995; Amude, Alfieri & Alfieri, 2006a; Amude, Alfieri & Alfieri, 2007; Wood et al., 2012). Estas infecções, geralmente, apresentam um predomínio de linfócitos e de plasmócitos no LCR, podendo esta pleocitose ser também observada na MARC crônica, na meningoencefalite granulomatosa (MEG) e nas meningites necrosantes (mais de 80% de linfócitos observados em CTCs não muito elevadas) (Tipold & Jaggy, 1994; Muñana & Luttgen, 1998; Kiš et al., 2008; Lowrie et al., 2009; Tipold & Schatzberg, 2010; Marcos & Santos, 2011; Wood et al., 2012).

Inúmeras afecções do sistema nervoso central provocam o aumento da concentração de linfócitos no LCR, desde alterações cerebrovasculares, a hérnias discais ou outros traumatismos, a infecções por protozoários e neoplasias (Vandeveldel & Spano, 1977; Lorenz et al., 2011a; Sruogo, 2011; Wood et al., 2012).

As contagens celulares são, muitas vezes, inconclusivas para o diagnóstico de neoplasias do SNC. Porém, no caso de linfoma/linfossarcoma, por vezes, a citologia do LCR é diagnóstica, observando-se células linfóides grandes e uniformes juntamente com uma população de linfócitos normais. Essas grandes células observadas, denominadas de células linfoblásticas, são facilmente reconhecidas pela presença de um núcleo rico em cromatina condensada, um nucléolo proeminente e por apresentar ruptura da membrana nuclear (Vandeveldel & Spano, 1977; Rosin, 1982; Pfaff, March & Fishman, 2000; Tipold, 2003; Ducoté & Dewey, 2008). Contudo, não se deve excluir neoplasias das listas de diferenciais apenas pela existência de CTCs normais, já que, mesmo no caso do linfoma/linfossarcoma, podem existir contagens e CDx normais (Lefbom & Parker, 1995).

11.3.2.1.2 - Células monocitóides

Em algumas afecções do SNC os monócitos são activados e transformados em macrófagos. Os macrófagos representam uma reacção inespecífica à inflamação, hemorragia ou degenerescência. Durante o CDx, por vezes, é possível observarem-se essas células vacuolizadas e/ou contendo material fagocitado, como detritos celulares, microorganismos ou eritrócitos (eritrofagocitose - sinal de hemorragia patológica não iatrogénica) (Meadows, MacWilliams, Dzata & Delauche, 1992; Tipold, 2003; Wood et al., 2012).

Como referido previamente, em casos de esgana a pleocitose mononuclear linfocítica é característica. Porém, por vezes, a população celular predominante são os monócitos. E, embora não muito comum, já foi descrita a presença de inclusões intracitoplasmáticas em monócitos no LCR de um cão diagnosticado com esgana (Alleman, Christopher, Steiner & Homer, 1992; Tipold, 1995; Abate et al., 1998; Ducoté & Dewey, 2008).

11.3.2.2 - Pleocitose neutrofílica

O termo "supurativo" é empregue quando existe um predomínio de neutrófilos. A pleocitose neutrofílica é característica de infecções bacterianas (supurativas) e na fase aguda da MARC asséptica. Menos comumente, as encefalites virais (como a esgana canina) e fúngicas também podem ter como consequência um aumento da população de polimorfonucleares neutrófilos. Estes neutrófilos observados no LCR no decorrer de processos infecciosos têm maior tendência a apresentar degenerescência do que os relacionados com doenças não-infecciosas (Radaelli & Platt, 2002; Seehusen, Reeves & Fomin, 2003; Tipold, 2003; Ducoté & Dewey, 2008; Wood et al., 2012).

Alterações assépticas também podem ser caracterizadas por este tipo de pleocitose, a saber afecções inflamatórias agudas como traumatismos, encefalites idiopáticas, hemorragias, enfartes, embolismo fibrocartilaginoso, necrose, meningite asséptica pós-meilográfica e neoplasias (Tipold, 2003; Ducoté & Dewey, 2008; Wood et al., 2012).

Vários tipos de tumores podem provocar esta alteração no LCR. Muitos autores descrevem que os meningiomas (principalmente os localizados na fossa caudal) estão correlacionados com pleocitoses neutrofílicas. Porém, Dickinson e seus associados (2006), num estudo retrospectivo de 19 anos, concluíram que o LCR colhido de doentes com meningiomas intracranianos não apresentavam pleocitoses neutrofílicas e altas CTCs como seria de esperar pela literatura existente (Ducoté & Dewey, 2008; Wood et al., 2012).

Está descrito também que pleocitoses neutrofílicas são comuns por períodos superiores a 72 horas após a realização de mielografias (Widmer, Blevins, Cantwell, Cook & DeNicola, 1990; Snyder, Tarigo & Neel, 2007; Di Terlizzi & Platt, 2009; Wood et al., 2012).

11.3.2.3 - Pleocitose mista

Uma pleocitose mista, como o próprio nome indica é caracterizada por uma mistura de populações celulares nomeadamente linfócitos mononucleares, neutrófilos e, ocasionalmente eosinófilos e plasmócitos (Wood et al., 2012).

Uma população mista é frequentemente observada em doenças inflamatórias por protozoários, infecções bacterianas crônicas, em lesões necróticas e, mais comum e predominantemente, na MEG (Meadows, MacWilliams, Dzata & Delauche, 1992; Tipold, 2003; Ducoté & Dewey, 2008; Wood et al., 2012). Pleocitoses ligeiras a moderadas podem ser o resultado de inflamações secundárias a, por exemplo, mielomalacias hemorrágicas, isquémia, enfarte ou até mesmo de hérnias discais. (Di Terlizzi & Platt, 2009; Marcos & Santos, 2011).

Nos casos de hérnias discais do tipo I pode encontrar-se um aumento da celularidade, com populações mistas de leucócitos, com o predomínio de linfócitos. Essas alterações são mais comuns em hérnias discais toracolombares do que em cervicais, especialmente em processos a avançar para a cronicidade (Windsor, Vernau, Sturges, Kass & Vernau, 2008).

Pleocitoses mistas também são observadas (com carácter moderado a grave) quando associada a infecções fúngicas (Criptococose, Blastomicose e Aspergilose), a Toxoplasmose e Neosporose, Erlichiose e Histoplasmoses (Meadows, MacWilliams, Dzata & Delauche, 1992; Maretzki, Fisher & Greene, 1994; Wood et al., 2012).

É importante notar-se que os neutrófilos degeneram mais rapidamente do que as células mononucleares. Se o tempo decorrido entre a colheita e as contagens celulares for muito elevado isso pode ter implicações para o diagnóstico (Steele et al., 1986).

11.3.2.4 - Pleocitose eosinofílica

As pleocitoses eosinofílicas são raras. Este tipo de pleocitose é descrito para a meningoencefalomielite eosinofílica responsiva a córticos (ou eosinofílica idiopática), havendo evidências de predisposições para raças como Golden retrievers e Rottweilers (Smith-Maxie, Parent, Rand, Wilcock & Norris, 1989; Bennett, Allan, Guilford, Julian & Johnston, 1997; Salvadori, Baroni, Arispici & Cantile, 2007; Di Terlizzi & Platt, 2009; Windsor, Sturges, Vernau & Vernau, 2009).

Tal como nos humanos, é possível encontrar-se um predomínio de eosinófilos no LCR em infecções protozoárias (e.g. Neosporose), fúngicas (e.g. Criptococose), em migrações parasitárias aberrantes, ocasionalmente em MEG, neoplasias e, muito raramente, em infecções virais como a esgana e a raiva (Vernau, 2000; Seehusen, Reeves & Fomin, 2003; Ducoté & Dewey, 2008; Di Terlizzi & Platt, 2009; Windsor, Sturges, Vernau & Vernau, 2009; Nghiem & Schatzberg, 2010; Wood et al., 2012).

11.3.2.5. - Outras alterações

A presença de plasmócitos no LCR pode ocorrer em casos de MEG, MEN ou outras doenças inflamatórias estando, porém, associados a respostas inflamatórias não-específicas (Wood et al., 2012).

Por vezes, em amostras citocentrifugadas, agentes infecciosos, incluindo bactérias, fungos (como o *Cryptococcus*), protozoários, Ehrlichia, Histoplasma e corpos de inclusão de esgana podem ser observados (Alleman, Christopher, Steiner & Homer, 1992; Meadows, MacWilliams, Dzata & Delauche, 1992; Abate et al., 1998; O'Toole, Sato & Rozanski, 2003; Wood et al., 2012).

Tabela 6 - Diagnósticos diferenciais de possíveis afecções do sistema nervoso central tendo em consideração as contagens celulares do líquido cefalorraquidiano. Adaptada de Wood, Garosi & Platt, 2012.

Pleocitose Mononuclear	Pleocitose Neutrófila	Pleocitose Mista	Pleocitose Eosinófila	Eritrócitos e Linfócitos
<ul style="list-style-type: none"> • <u>Encefalomielite virais</u> • MARC (SRMA) • MEN/LEN • Neoplasia (e.g. Linfoma) • MEG • Protozoários • Alterações Degenerativas (incluindo compressões) 	<ul style="list-style-type: none"> • <u>Encefalomielite bacterianas</u> • <u>MARC (SRMA)</u> • Neoplasia (e.g. Meningioma) • Fungos • Protozoários • Necrose • Herniações dos discos intervertebrais • Traumatismo/Hemorragia • Mielografia (artefacto) 	<ul style="list-style-type: none"> • <u>MEG</u> • Protozoários • Erlichiose • Fungos • Neoplasias • Embolia fibrocartilaginosa • Enfarte • Mielomalácia • Migrações parasitárias 	<ul style="list-style-type: none"> • <u>MEE</u> • <u>Migrações parasitárias</u> • Protozoários • Fungos 	<ul style="list-style-type: none"> • Trauma • Vascular

Menos comumente visualizam-se no LCR células neoplásicas, embora seja possível em tumores exfoliativos como linfoma, histiocitose maligna e carcinoma do plexo coróide, sendo que os processos neoplásicos apresentam contagens diferenciais extremamente inespecíficas (Tipold, 2003; Wood et al., 2012).

Na mielomácia ou em afecções desmielinizantes podem encontrar-se mielina (seja fagocitada por macrófagos ou mielina livre - fragmentos de mielina) (Cutler & Spertell, 1982; Bauer, Bassett, O'Neill & Acke, 2006; Wood et al., 2012).

Em doenças de armazenamento lisossomal é possível observar-se inclusões no interior das células mononucleares, sendo que a sua aparência depende do produto metabólico armazenado (Wood et al., 2012).

Um estudo realizado por Gonçalves e seus colegas (2010) sobre as alterações no LCR em cães com epilepsia, demonstrou que existe uma correlação negativa entre a CTCs e o tempo decorrido entre a última convulsão e a colheita de LCR (Gonçalves, Anderson, Innocent & Penderis, 2010)

Se as pleocitoses eosinófilicas são, *per si*, incomuns, a presença de parasitas no LCR é extremamente improvável, tendo sido descrito um caso da presença de uma larva de *Angiostrongylus vasorum* no LCR de um pug (Negrin, Cherubini & Steeves, 2008).

A tabela 6 apresenta os diagnósticos diferenciais de possíveis afecções do sistema nervoso central, tendo em consideração as contagens celulares do LCR.

11.4 - Culturas de microorganismos

Para o diagnóstico de uma meningoencefalomielite infecciosa podem ser realizadas culturas bacterianas, aeróbias e anaeróbias. Contudo, em medicina veterinária, as culturas

bacterianas de LCR raramente são de grande valor para a determinação do agente etiológico. Isso pode ocorrer porque o agente se encontra encarcerado num abscesso, ou porque está presente em pequenas quantidades. Por vezes os sinais de infecção são secundários a um metabolito bacteriano, e não devido ao agente *per si*, resultando em culturas negativas. O mau processamento do LCR e dos meios de cultura também podem influenciar o sucesso desta técnica. Assim, resultados positivos são raros, sendo espectável uma alta percentagem de falsos negativos (Peters, Pohlenz, Jatou, Ninet & Bille, 1995; Radaelli & Platt, 2002; Di Terlizzi & Platt, 2009; Wood et al., 2012).

Culturas de fungos e isolamento viral também podem ser realizados com algum sucesso no LCR. No entanto, continua a ser um teste insensível, tendo sido substituído por técnicas moleculares ou doseamento de anticorpos ou antigénios (Wood et al., 2012).

11.5 - Técnicas moleculares

A reacção de polimerase em cadeia (PCR) é uma óptima técnica pra identificação do material genético - ácido desoxirribonucleico (DNA) ou ácido ribonucleico (RNA) - de agentes infecciosos que não se detectam por culturas bacterianas (Di Terlizzi & Platt, 2009).

Na medicina humana, o uso do PCR para detecção de agentes no LCR revolucionou o diagnóstico de infecções do SNC. No caso da medicina veterinária, o PCR deve ser tido em consideração para o diagnóstico de meningoencefalites de etiologia desconhecida, idealmente conjuntamente com testes serológicos (Debiasi & Tyler, 2004; Nghiem & Schatzberg, 2010; Nilsson, Elfving & Pahlson, 2010).

Contudo, embora seja extremamente útil, os resultados de PCR obtidos devem ser tidos em conta criteriosamente, pois esta técnica não é desprovida de falhas. Para além disso, um PCR negativo não deve ser assumido como ausência de agentes infecciosos. Falsos negativos ocorrem devido a várias razões, a saber 1) o material genético do agente infeccioso pode estar presente em ínfimas quantidades, não sendo possível a sua polimerização em cadeia, 2) estar presente apenas no parênquima e não no LCR, 3) simplesmente o agente já não está presente, embora a afecção ainda tenha sintomatologia e 4) estarem presentes no LCR inibidores de PCR (Nghiem & Schatzberg, 2010; Di Terlizzi & Platt, 2009).

Existem várias alterações ao PCR convencional, sendo que, dependendo do agente suspeito, devem-se aplicar as técnicas mais sensíveis e específicas para a obtenção do diagnóstico (Nghiem & Schatzberg, 2010).

O PCR convencional é usado para a amplificação da grande maioria dos agentes infecciosos como o *Morbilivirus*, *Toxoplasma gondii*, *Neospora caninum*, *Ehrlichia canis*, *Rickettsia rickettsii* (McBride et al., 1996; Stiles, Prade & Greene, 1996; Goodman, et al., 2003; Jalal, Nord, Lappalainen & Evengard, 2004; Amude, Alfieri & Alfieri, 2006b; Kidd et al., 2008, Jaderlund, Bergstrom, Egenvall, Hedhammar, 2009). Schatzberg e colegas (2003)

demonstraram que uma ferramenta semelhante ao PCR para o diagnóstico de toxoplasmose ou neosporose é o PCR-multiplex (Schatzberg et al., 2003). No caso de suspeita de esgana, o PCR com transcrição reversa (RT-PCR) é o ideal e mais sensível para o diagnóstico *ante-mortem*, amplificando o RNA viral (Frisk, König, Moritz & Baumgartner, 1999; Saito, Alfieri, Wosiacki & Negra, 2006). A tabela 7 resume quais os agentes mais relevantes que podem ser responsáveis por doenças infecciosas do SNC do cão e quais os testes que se podem realizar para o seu diagnóstico.

O Anexo 3 contém uma tabela resumo das características normais e anormais do LCR.

Tabela 7 - Testes de doenças infecciosas no líquido cefalorraquidiano. Adaptada de Wood, Garosi & Platt, 2012.

Agente infeccioso	Título de anticorpo	PCR
<i>Morbillivirus</i>	+	+
<i>Ehrlichia canis</i>	+	+
<i>Rickettsia rickettsii</i>	+	+
<i>Toxoplasma</i>	+	+
<i>Cryptococcus*</i>	-	-

* Para o diagnóstico de *Cryptococcus* a titulação de antígeno é altamente sensível e específica.

Parte III - Parte prática/Componente experimental

1 - Material e Métodos

A componente prática desta dissertação visou compilar as possíveis alterações que se podem verificar no LCR aquando da presença de afecções do SNC do cão, de modo a aferir-se a importância da realização da análise deste líquido por rotina em doentes neurológicos. Também se decidiu estudar as possíveis relações estatísticas entre a colheita ou não de LCR e a obtenção de um diagnóstico definitivo e se a obtenção de LCR tem alguma influência no número e no peso de exames necessários para a obtenção de um diagnóstico.

1.1 - Material de estudo

O material de estudo para a feitura desta dissertação foi o LCR colhido de animais examinados na Clínica Veterinária Referência Veterinária durante o estágio curricular, com duração de 6 meses¹⁴. Dentre a casuística total de 171 animais, 156 são cães e apenas 143 é que constituíram o objecto de estudo. A colheita e análise de LCR foram realizadas em 37 doentes, sendo a sua escolha totalmente dependente da neurolocalização da lesão e da autorização escrita prévia dos proprietários. A distribuição de sexo, idade e raça dos doentes é totalmente aleatória, tendo em conta que os animais estudados pertencem a proprietários que recorrem aos serviços médicos veterinários por referência de outros MV ou à procura de segundas opiniões. Informações adicionais sobre a casuística encontram-se no Anexo 1. Assim sendo, temos dois grupos distintos: o grupo "LCR" (n = 37) onde estão representados os animais em que se colheu LCR, e o grupo "S/LCR" (Sem LCR; n = 106).

1.2 - Material

1.2.1 - Colheita e análise de LCR

Todo o material utilizado para os procedimentos descritos na alínea 1.3 do presente capítulo estão de acordo com a bibliografia pesquisada, salvo algumas excepções em que se realizaram algumas adaptações devido à indisponibilidade de material ou constrangimentos de orçamento.

Genericamente foram utilizadas três agulhas para punção, todas elas Spinocan (Braun®), nomeadamente agulhas de 75 mm ou de 40 mm, ambas com 22G ou a de 75 mm com 25G. O poço de sedimentação era feito com uma lâmina de vidro (Lâminas Micro Slides, Normax®), com uma seringa (Braun) de 5 mL cortada a meio e posicionada com a extremidade lisa do corpo e fixa com auxílio de plasticina (J. Ribeiro, comunicação pessoal, 25 Setembro, 2011).

¹⁴ Para mais informações consultar Anexo 1 - Breve descrição das actividades realizadas durante o estágio curricular e casuística.

As CTCs eram feitas com recurso a uma câmara de Neubauer (0,100mm - 0,0025mm², Brand Blaubrand ®). Ambas as câmaras eram cheias com o LCR e a contagem era realizada com o auxílio de um microscópio óptico (Olympus CH-2®).

Para o CDx, a lâmina era fixada com metanol e corada com corantes azul e vermelho (Microscopy Hemacolor, Reativo Corante Azul e Vermelho, Merck®). A observação era feita novamente no mesmo microscópio óptico.

Para o teste de Pandy, para além do reagente de Pandy (ácido carbólico) foram utilizados tubos de ensaio de plástico onde se realizava a reacção.

1.2.2 - Análise estatística

Os dados da casuística foram compilados em tabelas com Microsoft®Word:Mac2011 e em folhas de Microsoft®Excel:Mac²⁰¹¹, onde se construíram alguns gráficos, apresentados na secção "Resultados". Para o tratamento estatístico dos dados utilizou-se o programa IBM®SPSS®Statistics version 20.

Neste estudo têm-se diversas variáveis a analisar, a saber:

- Espécie - realizou-se apenas uma análise estatística descritiva desta variável.
- Idade - embora não tenha havido uma escolha do intervalo de idades dos doentes, é interessante realizar-se uma estatística descritiva desta variável.
- LCR - esta variável nominal refere-se à colheita ou não de LCR, sendo que o "1" é utilizado para caracterizar os animais em que se obteve uma amostra de LCR e o "0" os doentes em que não se realizou a punção e colheita de líquido.
- Dx - esta variável nominal refere-se ao diagnóstico definitivo. Se se tiver alcançado o diagnóstico os animais são representados por um "1", caso contrário utiliza-se o "0".
- NúmeroMCD - número de meios complementares de diagnóstico (MCD) utilizados por animal.
- PesoMCD - para a obtenção do diagnóstico são utilizados MCD. Cada exame realizado tem custos e riscos associados, não deixando de parte o tempo necessário para a realização de cada exame e a obtenção dos resultados. Numa tentativa de medir todas essas características criou-se a variável PesoMCD, representando o "peso" simbólico que cada exame, individualmente, tem no processo diagnóstico (Tabela 8). Assim sendo, para cada animal, determinou-se o "peso" total que os MCD tiveram durante o seu exame diagnóstico, somando-se os pesos individuais de cada exame realizado. Tendo em conta os factores referidos acima decidiu-se atribuir os seguintes valores: Estudo radiográfico - 1; Colheita e análise de LCR - 2; Mielografia - 3; Ressonância magnética - 4; Outros: testes sanguíneos - 1.

Tabela 8 - Meios complementares de diagnóstico e seus respectivos pesos.

MCD	Rx	LCR	Mielografia	RM	Outros
Peso	1	2	3	4	1

MCD - Meios complementares de diagnóstico; Rx - Estudo radiográfico; LCR - colheita e análise de líquido cefalorraquidiano; RM - Ressonância magnética; Outros - Testes sanguíneos.

1.3 - Métodos

1.3.1 - Colheita e análise de LCR

Todos os doentes a quem se recolheu LCR foram submetidos a uma avaliação cárdio-respiratória previamente à indução anestésica e administração de anestesia geral pelo cardiologista da clínica.

A colheita de LCR foi realizada seguindo as directrizes descritas anteriormente na revisão bibliográfica (em 3.8 - Colheita de LCR). A escolha do local de punção baseou-se sempre na neurolocalização da lesão ou lesões presentes, após a realização de um completo e minucioso exame neurológico. Na eventualidade da necessidade de recorrer-se à mielografia, as colheitas foram feitas sempre imediatamente antes da administração de contraste.

A preparação de todos os animais foi realizada pelos estagiários responsáveis pelos caso, auxiliados pelas enfermeiras do serviço. Após a tricotomia e higienização do local de punção, os doentes eram posicionados e a colheita era realizada pelo Dr. João Ribeiro.

As colheitas foram feitas com agulhas de punção lombar escolhidas de acordo com a profundidade a puncionar (ver 1.2 para descrição das agulhas utilizadas).

Durante as punções/colheitas, algumas das primeiras gotas de LCR eram colhidas directamente para um poço de sedimentação preparado previamente. Essa aliquota era deixada a repousar durante, aproximadamente, 30 minutos antes de se proceder à realização da CTC e do CDx.

As amostras para CTCs eram obtidas com o auxílio de uma seringa estéril (não se aplicando pressão negativa), apenas recolhendo as gotas que se formam no canhão da agulha. O LCR assim obtido era utilizado para as contagens celulares totais numa câmara de Neubauer e a contagem era realizada no microscópio óptico.

Para obter a melhor acuidade na realização desta análise, padronizou-se o método de contagem. Assim, em ambas as câmaras do hemocitómetro os quatro quadrados de cada extremidade (a laranja na Figura 6) e o quadrado central (a azul na Figura 6) são contados. Grosseiramente, os 10 quadrados contados correspondem a 1 μ L.

Figura 6 - Hemacitómetro (câmara de Neubauer) e representação esquemática de uma das zonas de contagens de células da câmara (Figura original).



Para o CDx, após o tempo de sedimentação de cerca de 30 minutos, o excesso do líquido era retirado com pipetas de plástico descartáveis e a lâmina fixada, corada e vista no microscópio. Nem toda a extensão da lâmina era observada, apenas a superfície onde o LCR esteve em contacto com a lâmina durante a sedimentação. No caso de pleocitose, eram determinadas as proporções das células presentes.

Todas as contagens eram anotadas num diário clínico e posteriormente incluídas nos registos clínicos de cada doente num sistema informático.

Algumas gotas do líquido colhido eram utilizadas para a realização do Teste de Pandy. Num pequeno tubo de ensaio de plástico, com cerca de 2 a 3 ml de Reagente de Pandy, acrescentavam-se 3 a 4 gotas do LCR, observava-se o resultado da reacção e anotava-se no diário clínico. Todos os resultados eram observados por pelos menos duas pessoas e confirmados sempre pelo Dr. João Ribeiro devido ao carácter subjectivo do teste.

O resto das amostras que não eram utilizadas para contagens celulares ou Pandy eram guardadas refrigeradas. Após os exames imagiológicos (mielografia e/ou RM) decidir-se-ia se seriam necessários mais testes, nomeadamente testes que recorressem a técnicas moleculares.

Nos doentes em que se suspeitava de doenças inflamatórias infecciosas essas amostras seriam, então, encaminhadas para laboratórios externos. Em todos os pacientes realizava-se, se acordado pelos proprietários dos doentes, uma bateria de exames, a saber: determinação de proteína totais e perfil electroforético proteico e pesquisa de agentes infecciosos. Neste último caso pesquisou-se *Morbillivirus*, *Ehrlichia canis*, *Cryptococcus*, *Neospora* e *Toxoplasma*.

1.3.2 - Tratamento estatístico

As variáveis sexo, idade, LCR, S/LCR, NúmeroMCD e PesoMCD foram sujeitas a análises estatísticas descritivas, determinando-se as suas frequências absolutas e relativas, médias, variâncias e desvios-padrão, quando justificável.

Para determinar se a utilização de testes paramétricos ou não-paramétricos seria a mais correta, utilizou-se o teste de Kolmogorov–Smirnov para testar a normalidade da distribuição

das variáveis em estudo: NúmeroMCD e PesoMCD. Este teste avalia se uma amostra é retirada de uma dada distribuição, ou se duas amostras são provenientes da mesma distribuição (Anexo 5).

Após verificada a normalidade das variáveis, foram também averiguadas as possíveis relações entre as variáveis NúmeroMCD-LCR e PesoMCD-LCR através do teste não paramétrico para duas variáveis independentes de Mann-Whitney U (Anexo 6).

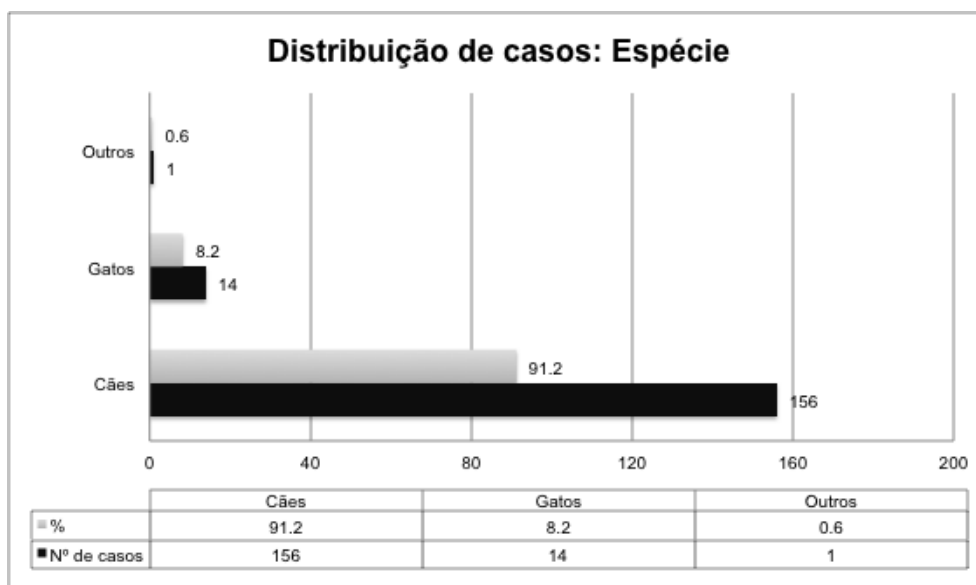
Analizou-se a relação entre as variáveis LCR e Dx através do teste de chi-quadrado, estudando a relação entre duas variáveis categóricas considerando a independência das variáveis como a hipótese nula (H_0). Neste estudo em específico a H_0 é que a obtenção de um diagnóstico definitivo é independente da colheita e análise de LCR (Anexo 7).

2 - Resultados

2.1 - Estatística descritiva

Durante o estágio curricular foram observados 171 casos (ver "Anexo 1 para informações adicionais). No Gráfico 1 está representada a distribuição dos doentes, tendo em conta a espécie examinada¹⁵.

Gráfico 1 - Frequências absolutas e relativas da totalidade da casuística (N = 171), de acordo com as espécies examinadas durante os 6 meses de estágio.



A idade não foi uma variável controlada neste estudo, porém para fins descritivos achou-se interessante analisar a distribuição de idades (tabela 9).

Tabela 9 - Estatística descritiva da variável idade em anos.

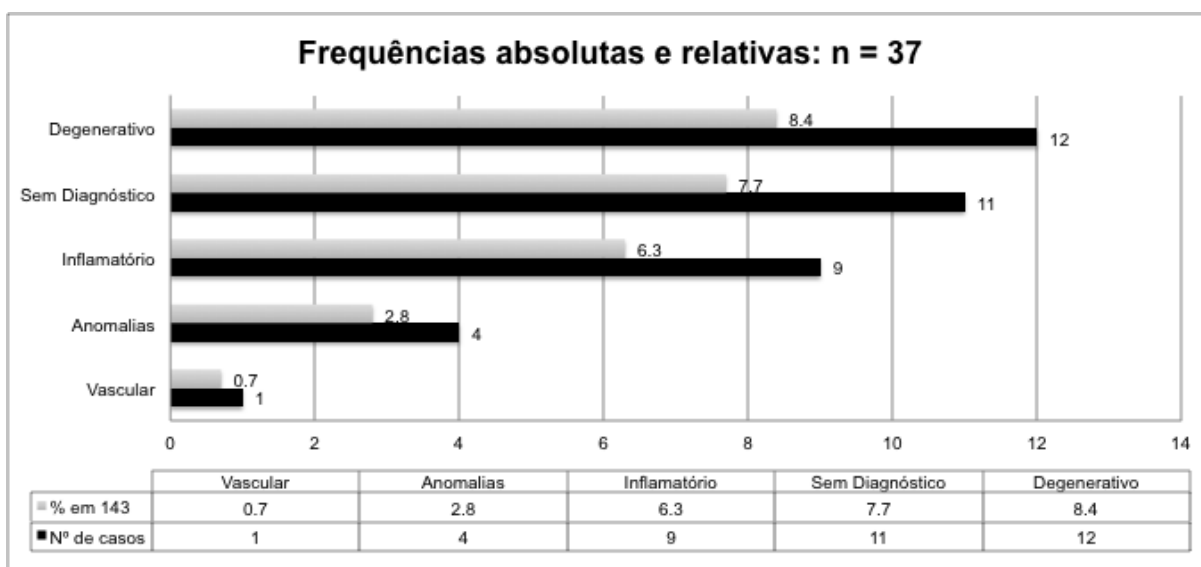
	N	Mínimo	Máximo	Média
Idade	143	0.5	17	6.98

¹⁵ No gráfico 1, os "Outros" refere-se a apenas um furão.

Dos 156 cães que foram referidos à RRV, apenas foram colhidas amostras de LCR em 37 animais, nos quais se efectuaram sempre a CTC, o CDx e o teste de Pandy. Outros líquidos foram colhidos, porém não foram realizadas as contagens diferenciais e/ou o teste de Pandy em todos, de modo que para haver uniformidade nos casos analisados essas amostras não foram incluídas no estudo¹⁶.

Em 1 dos 37 casos efectuou-se apenas a colheita e análise de LCR, sendo que em todos os restantes 36 animais, do grupo LCR, recorreu-se sempre a pelo menos um método imagiológico auxiliar de diagnóstico. De acordo com a história pregressa, o exame neurológico, os exames realizados e os resultados neles obtidos, agrupou-se os doentes em 5 diferentes classes, como se pode verificar no Gráfico 2.

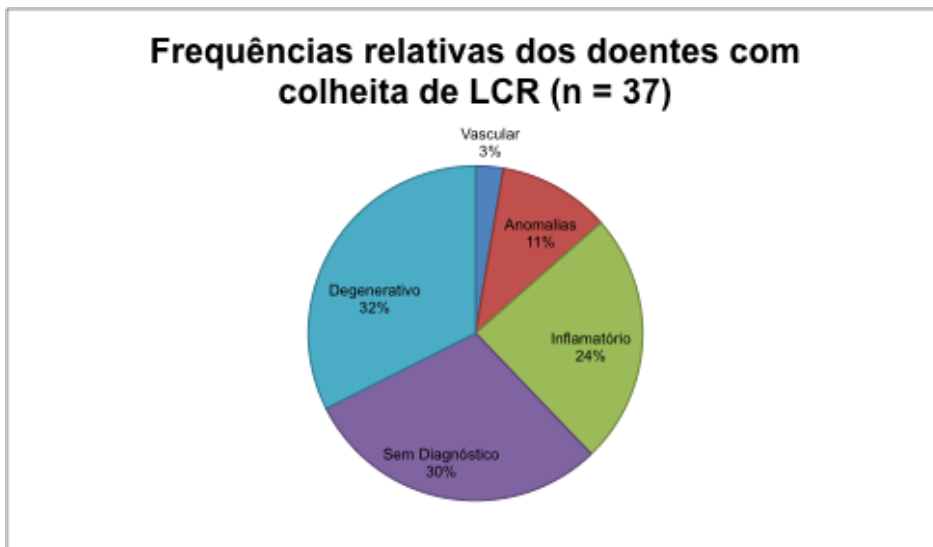
Gráfico 2 - Frequências absolutas e relativas do grupo onde se colheu e analisou o líquido cefalorraquidiano (N=37). Os animais foram agrupados em 5 diferentes grupos, de acordo com os resultados dos meios complementares de diagnóstico realizados. Esta divisão agrupa os doentes em 4 "classes" de afecções ou alterações do SNC, caso se tenha obtido o diagnóstico definitivo e uma classe referente aos animais "Sem Diagnóstico".



Com as diferentes classes criadas anteriormente e tendo em conta as respectivas frequências relativas, verifica-se, no Gráfico 3, que grande parte dos casos onde se procedeu à punção e colheita de LCR (n = 37) eram animais com alterações degenerativas (8,4% para n = 143) ou inflamatórias (6,3% para n = 143).

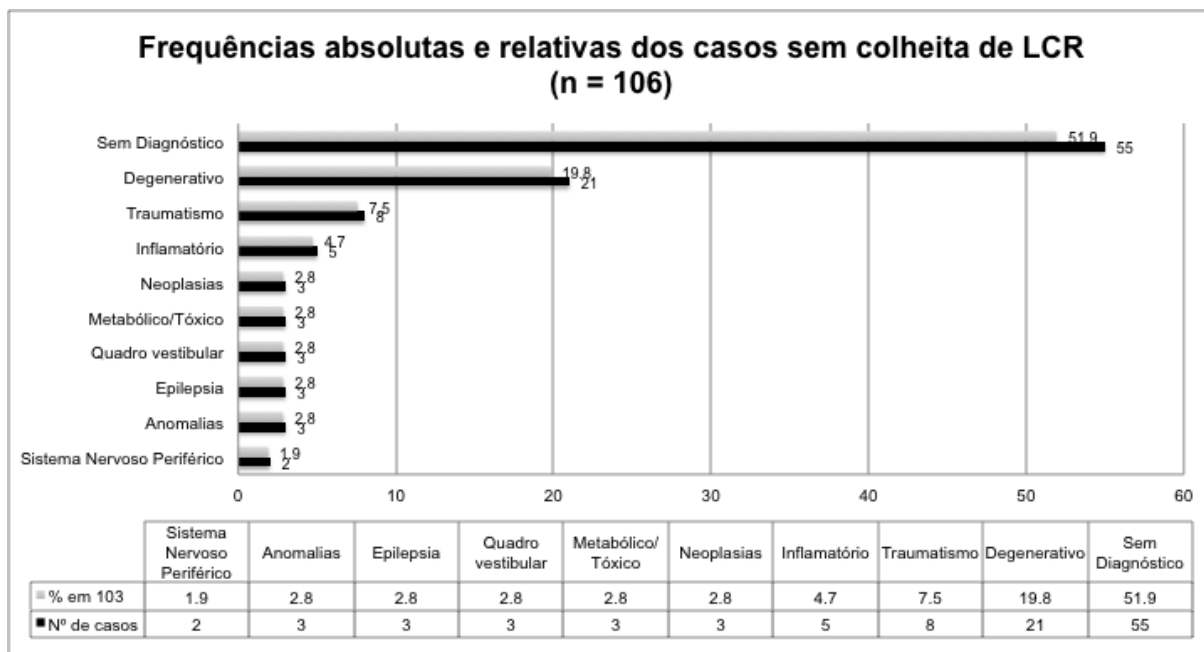
¹⁶ Dos 156 cães observados, 13 deles não foram incluídos no estudo por não se terem informações suficientes com relação ao LCR deles obtido.

Gráfico 3 - Frequências relativas dos doentes com colheita de LCR (n = 37).



Considerando apenas o grupo "LCR" verifica-se que a maioria dos animais onde se colheu LCR pertencem às classes de alterações degenerativas (32%), inflamatórias (24%), sendo que numa grande percentagem de doentes não se alcançou um diagnóstico definitivo (30%). Com relação o grupo "S/LCR" realizou-se uma classificação em classes semelhante à descrita anteriormente, representada no Gráfico 4.

Gráfico 4 - Frequências absolutas e relativas dos casos sem colheita de LCR (n = 106). Os animais deste grupo (n = 106) foram agrupados em 10 grupos: nove deles referentes a alterações ou afecções diagnosticadas e 1 deles que diz respeito aos animais sem diagnóstico final.



No grupo "S/LCR" observa-se também uma grande percentagem de casos sem diagnóstico definitivo (51,9%), sendo que em termos diagnósticos definitivos a classe "Degenerativo" é a que se apresenta com maior percentagem (19,8 %) de doentes. Cruzando a informação do

grupo "LCR" com a do grupo "S/LCR" é interessante verificar-se que as classes com maior frequências absolutas em ambos os grupos são as das alterações "Degenerativas", das afecções "Inflamatórias" e dos doentes "Sem Diagnóstico" (Gráfico 5).

Como mencionado anteriormente, em apenas um dos casos do grupo "LCR", pertencente à classe "Inflamatórias" e diagnosticado com Mielite por *Morbillivirus* (esgana), foi realizada unicamente a colheita de LCR, sem recurso a qualquer outro MCD, contrariamente a todos os outros animais onde se recorreram a pelo menos 2 MCDs (Gráfico 6).

Gráfico 5 - Frequências relativas das diferentes classes de alterações do SNC (n = 143).

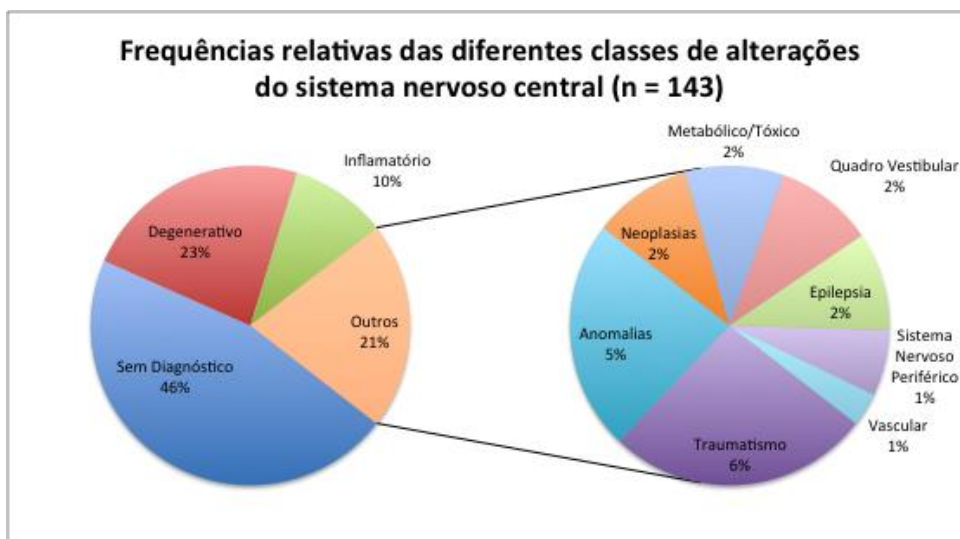
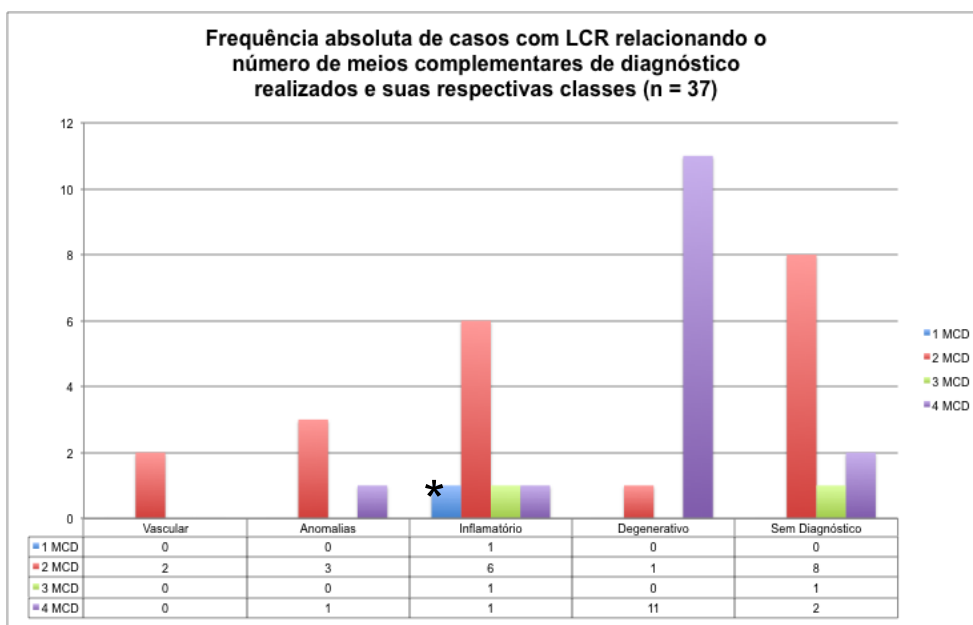


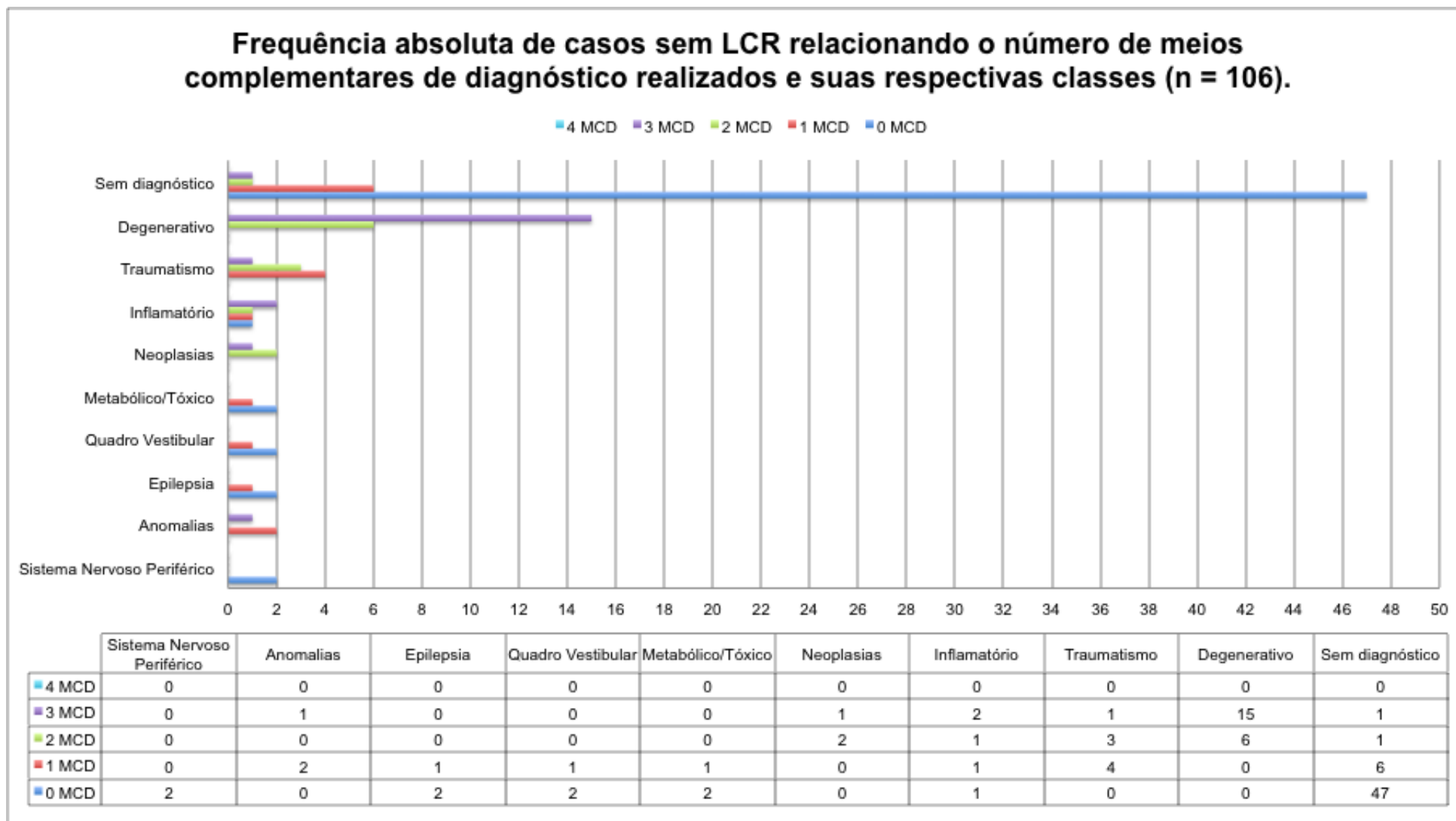
Gráfico 6 - Frequência absoluta de casos com LCR relacionando o número de meios complementares de diagnóstico realizados e suas respectivas classes (n = 37).



MCD - Meio complementar de diagnóstico; * - Representa o único caso onde o único MCD realizado foi a colheita de LCR.

Fez-se a mesma determinação do número de MCD realizados por classes de afecções para os animais pertencentes ao grupo "S/LCR" (Gráfico 7).

Gráfico 7 - Frequência absoluta de casos sem LCR relacionando o número de meios complementares de diagnóstico realizados e suas respectivas classes (n = 106).



Independentemente das classes de afecções, mas comparando as variáveis NúmeroMCD nos grupos "LCR" e "S/LCR" obteve-se a seguinte tabela resumo (Tabela 10).

Tabela 10 - Frequências absolutas do número de meios complementares de diagnóstico realizados nos diferentes grupos (LCR e S/LCR).

		NúmeroMCD					Total
		0	1	2	3	4	
LCR	0	55	17	11	23	0	106
	1	0	1	19	2	15	37
Total		55	18	30	25	15	143

LCR 0 - corresponde ao grupo "S/LCR"; LCR 1 - refere-se ao grupo "LCR".

Tendo em conta os MCD que se realizaram em cada caso, para além do número, decidiu-se avaliar o "peso" que o conjunto de exames realizados representa para cada animal. Como explicado na secção Material e Métodos, criou-se uma nova variável denominada PesoMCD referente ao peso total que todos os MCD realizados por animal têm durante o exame clínico dos doentes. A tabela 11 contém a distribuição dos diferentes pesos nos grupos "LCR" e "S/LCR".

Tabela 11 - Frequências absolutas do peso dos meios complementares de diagnóstico realizados nos diferentes grupos (LCR e S/LCR). Para cada animal somou-se o peso relativo de cada exame realizado obtendo-se um PesoMCD Total.

		PesoMCD Total								
		0	1	2	4	5	6	7	8	10
LCR	0	55	9	0	12	7	3	0	20	0
	1	0	0	1	0	0	20	1	0	15
Total		55	9	1	12	7	23	1	20	15

LCR 0 - corresponde ao grupo S/LCR; LCR 1 - refere-se ao grupo LCR.

2.2 - Estatística comparada

Realizou-se o teste de Kolmogorov–Smirnov para testar a normalidade da distribuição das variáveis em estudo NúmeroMCD e PesoMCD (tabelas 12 e 13; Anexo 5).

Tabela 12 - Teste de normalidade de Kolmogorov–Smirnov para a variável número de meios complementares de diagnóstico realizados.

	LCR	Kolmogorov-Smirnov ^a		
		Estatística	Grau de liberdade	Significância
NúmeroMCD	0	.316	106	.000
	1	.336	37	.000

a. Correção da Significância de Lilliefors

Tabela 13 - Teste de normalidade de Kolmogorov-Smirnov para a variável peso dos meios complementares de diagnóstico realizados.

	LCR	Kolmogorov-Smirnov ^a		
		Estatística	Graus de Liberdade	Significância
PesoMCD	0	.306	106	.000
	1	.329	37	.000

a. Correção da Significância de Lilliefors

Após verificar que as variáveis NúmeroLCR e PesoLCR não têm distribuição normal, decidiu-se realizar um teste não-paramétrico para variáveis independentes de modo a aferir a possível relação entre o número e o peso dos MCD com a existência de diagnóstico, dentro dos grupos "LCR" e "S/LCR". O teste escolhido foi o de Mann-Whitney U. As tabelas 14 e 15 são referentes à variável NúmeroMCD e as tabelas 16 e 17 dizem respeito ao PesoMCD (ver Anexo 6).

Tabela 14 - Médias do número de meios complementares de diagnósticos realizados nos grupos "LCR" e "S/LCR", tendo em conta a existência ou não de diagnóstico definitivo.

	Diagnóstico	Média NúmeroMCD
LCR	Dx 0	2,5
	Dx 1	3,0
S/LCR	Dx 0	0,3
	Dx1	1,0

LCR - grupo onde se realizou colheita de LCR; S/LCR - grupo onde não se realizou colheita de LCR; Dx 0 - sem diagnóstico; Dx 1 - com diagnóstico; NúmeroMCD - variável número de meios complementares de diagnóstico realizados.

Tabela 15 - Testes não paramétricos para variáveis independentes (NúmeroMCD e LCR), com especial destaque para o teste de Mann-Whitney U e a Significância assintótica a negrito.

	NúmeroMCD
Mann-Whitney U	607.000
Z	-6.488
Significância Assintótica	.000

Tabela 16 - Médias do peso de meios complementares de diagnósticos realizados nos grupos "LCR" e "S/LCR", tendo em conta a existência ou não de diagnóstico definitivo.

	Diagnóstico	Média PesoMCD
LCR	Dx 0	6,8
	Dx 1	7,8
S/LCR	Dx 0	0,7
	Dx1	4,6

LCR - grupo onde se realizou colheita de LCR; S/LCR - grupo onde não se realizou colheita de LCR; Dx 0 - sem diagnóstico; Dx 1 - com diagnóstico; PesoMCD - variável peso dos meios complementares de diagnóstico realizados.

Tabela 17 - Testes não paramétricos para variáveis independentes (PesoMCD e LCR), com especial destaque para o teste de Mann-Whitney U e a Significância assintótica a negrito.

	PesoMCD
Mann-Whitney U	492.000
Z	-7.006
Significância assintótica	.000

De modo a aferir se existe alguma relação entre as variáveis LCR e Dx fez-se o teste de Chi-quadrado (tabela 18 e Anexo 7).

Tabela 18 - Teste de Chi-quadrado para as variáveis LCR e Dx numa tabela de dupla entrada (2x2) e 1 grau de liberdade.

	Valor	Graus de Liberdade	Sig. Assimp. (de dois lados)	Sig. Exacta (de dois lados)	Sig. Exacta (de um lado)
Pearson Chi-Square	5.418 ^a	1	.020		
Correcção de Continuidade ^b	4.563	1	.033		
Rácio de semelhança	5.564	1	.018		
Teste Exacto de Fisher				.022	.016
N de casos válidos	143				

a. 0 células (.0%) tiveram contagens expectáveis com menos de 5. A contagem mínima expectável é de 17.08.

b. Calculada apenas para uma tabela de 2x2.

2.3 - Alterações do LCR e as suas respectivas classes

De acordo com as classes acima descritas desenharam-se as tabelas 19 a 22. Cada tabela refere-se a uma classe diagnóstica, estando descritas as CTC, o CDx, o Teste de Pandy, o diagnóstico definitivo e algumas observações pertinentes aos casos onde se colheram LCR.

Tabela 19 - Resultados da análise dos LCR do caso referente à classe "Vascular".

Aspecto	CTC	CDx	Pandy	Diagnóstico	Observações
Incolor e transparente	162	Pleocitose mononuclear	(++++)	Trombo/ tromboembolismo fibrocartilágneo	-----

CTC - Contagem total de células; CDx - Citodiagnóstico; Pandy - Teste de Pandy.

Tabela 20 - Resultados da análise dos LCR dos casos referentes à classe "Inflamatório".

Aspecto	CTC	CDx	Pandy	Diagnóstico	Observações
Incolor e transparente	7	Pleocitose mononuclear	(-)	Neosporose	Linfócitos atípicos e neutrófilos esporádicos
Turvo e xantocrômico	Incontável	Pleocitose neutrofílica (80%)	(++)	Meningite-arterite responsiva a córticos (MARC)	Contaminação sanguínea e presença de eritrofagocitose
Incolor e transparente	108	Pleocitose mononuclear	(-)	MARC	-----
Incolor e transparente	24	Pleocitose mononuclear	(+)	Meningoencefalite granulomatosa (MEG)	Com corticoterapia e ciclosporina
Incolor e transparente	53	Pleocitose mononuclear	(+)	MEG	-----
Incolor e transparente	10	Pleocitose mononuclear	(+)	Esgana	PCR positivo
Incolor e transparente	> 1000	Pleocitose mista (predomínio de neutrófilos)	(++)	Esgana	Positivo a IgM e IgG
Incolor e transparente	17	Pleocitose mononuclear	(-)	MEG	-----
Incolor e transparente	170	Pleocitose neutrofílica	(+)	MARC	-----

CTC - Contagem total de células; CDx - Citodiagnóstico; Pandy - Teste de Pandy.

Tabela 21 - Achados clínicos da análise dos LCR do caso referente à classe "Anomalias".

Aspecto	CTC	CDx	Pandy	Diagnóstico	Observações
Incolor e transparente	19	Pleocitose mononuclear	(-)	Hemivértebras T6 e T7	-----
Xantocrômico	Incontável	Pleocitose mononuclear	(-)	Síndrome de Chiari	Contaminação sanguínea
Incolor e transparente	4	População mononuclear	(-)	Síndrome de Chiari	-----
Incolor e transparente	4	População mononuclear	(-)	Síndrome de Chiari	-----

CTC - Contagem total de células; CDx - Citodiagnóstico; Pandy - Teste de Pandy.

Tabela 22 - Resultados da análise dos LCR dos casos referentes à classe "Degenerativo".

Aspecto	CTC	CDx	Pandy	Dx	Observações
Incolor e transparente	2	População mista	(-)	Hérnia discal (HD)	Dois neutrófilos e uma célula mononuclear observados
Incolor e transparente	27	Pleocitose neutrofílica (90% de neutrófilos)	(++/+++)	HDIV	-----
Incolor e transparente	1	-----	(-)	HDIV	Nenhuma célula observada no CDx
Incolor e transparente	3	População mononuclear	(-)	HDIV	Uma célula mononuclear observada
Xantocrômico	Incontável	População mista com inúmeros eritrócitos	(+)	HDIV	Contaminação sanguínea
Incolor e transparente	2	-----	(-)	HDIV	Nenhuma célula observada no CDx
Incolor e transparente	1	-----	(-)	HDIV	Nenhuma célula observada no CDx
Incolor e transparente	3	População mista	(-)	HDIV	Observados três mononucleares e um neutrófilo
Incolor e transparente	2	-----	(-)	HDIV	Nenhuma célula observada no CDx
Incolor e transparente	2	População mononuclear	(-)	HDIV	Uma célula mononuclear observada
Incolor e transparente	30	Pleocitose mononuclear	(-)	HDIV	Presença de hematoma no canal medular
Incolor e transparente	40	Pleocitose mononuclear	(-)	HDIV	-----

CTC - Contagem total de células; CDx - Citodiagnóstico; Pandy - Teste de Pandy.

3 - Discussão

3.1 - Estatística descritiva

No que concerne as frequências, absolutas e relativas, de casos por espécie, verificou-se que a esmagadora maioria (91,2%) dos casos examinados são canídeos (Gráfico 1). Tendo em conta que apenas 14 gatos e 1 furão foram observados durante os 6 meses de estágio, decidiu-se que o material de estudo para a presente dissertação seria apenas os canídeos, devido à sua maior representatividade (91,2%) na casuística¹⁷.

Como todos os animais observados na RRV são referências de outros MV, a variável espécie não pôde ser controlada de modo a obter-se uma distribuição mais uniforme dos doentes. Contudo, é interessante notar essa discrepância entre o número de cães e gatos examinados. É difícil compreender o porque desta disparidade de valores, porém podem-se supor algumas razões, a saber:

- muitas das afecções do SNC nos gatos têm etiologia infecciosa, de modo que os gatos que vivam exclusivamente sem acesso ao exterior têm exposições reduzidas a esses agentes;
- pelo mesmo motivo, alterações resultantes da exposição a tóxicos não são comuns em gatos que não têm acesso ao exterior;
- a rotina diária que os proprietários têm com os seus animais de estimação da espécie canina aumenta a exposição destes a certos agentes infecciosos, predispondo-os a certas afecções do SNC;
- grande parte dos traumatismos sofridos pelos felídeos são relacionados com quedas em altura ou atropelamentos, sendo que a taxa de sobrevivência a esses traumatismos não é muito elevada (Bergman, 2006);
- pode-se afirmar que um número muito mais baixo de gatos são referenciados, quando comparado com os cães. Provavelmente, os proprietários escolhem não investir no tratamento de doenças neurológicas, sendo que os gatos nem chegam a clínica de referência.

Os gráficos 2 a 5 apresentam a distribuição da casuística tendo em consideração as afecções diagnosticadas. Mais especificamente no gráfico 5, verifica-se que a classe com maior percentagem de casos é a classe das alterações "Degenerativas" com 23,1% (para n = 143) e as doenças "Inflamatórias" com 9,8% (para n = 143). Dentro das alterações degenerativas, as com maior relevância e mais diagnosticada durante o estágio são as hérnias discais. Isso não constitui uma surpresa e realmente vai de encontro com a bibliografia que afirma que as HDIV são as alterações mais frequentemente observadas na clínica (Coates, 2004; Lorenz et al., 2011b).

¹⁷ Para mais informações sobre os "Gatos" veja o Anexo 4; não foi realizada colheita de LCR no furão.

Com grande relevância na distribuição de casos estão os doentes pertencentes à classe "Sem Diagnóstico", com uma frequência relativa de 46%, para n = 143 (gráfico 5). Este valor elevado pode representar em si a dificuldade em se atingir o diagnóstico definitivo, contudo, existem vários factores e razões que justificam este valor elevado:

- muitos dos casos referenciados que chegam à RRV apenas realizam a primeira consulta (onde se faz o exame neurológico e a neurolocalização). Com a neurolocalização, história pregressa e sintomatologia traça-se um plano diagnóstico e sugere-se uma lista de MCDs que possam ser de auxílio para a determinação da etiologia. Porém, muitos proprietários não prosseguem com o plano sugerido, seja pelo facto de terem limitações económicas, seja porque as alterações neurológicas não justificam o investimento.
- 3 dos animais observados chegaram à consulta apresentando um nível de disfunção neurológica de grau 5 (paraplégia com perda da sensibilidade à dor profunda) na escala de Wheeler, há mais de 24 horas. Tal como a bibliografia refere, o prognóstico é mais reservado à medida que o grau de lesão aumenta, fazendo com que os proprietários tenham decidido não continuar a investigação diagnóstica e tentativa de tratamento (Scott, 1997; Scott & Mckee, 1999; Sharp & Wheeler, 2005).
- 2 dos cães examinados apenas apresentavam nível de disfunção neurológica de grau 2 (paraparésia ambulatória) na escala de Wheeler. Embora a neurolocalização (T3-L3) e os défices neurológicos sejam altamente sugestivos de alterações degenerativas, nomeadamente de HDIV, visto não terem sido realizados quaisquer exames que possam corroborar a suspeita diagnóstica, estes casos foram incluídos na classe "Sem Diagnóstico" (Scott, 1997; Scott & Mckee, 1999; Sharp & Wheeler, 2005; Levine, 2007).
- O descrito no ponto anterior também se aplica para casos com sintomatologia neurológica e histórias pregressas sugestivas de doenças inflamatórias ou de neoplasias. Muitos destes casos não realizaram punção e colheita de LCR e/ou RM, onde se poderiam descartar ou confirmar certos diagnósticos, sendo que esses casos passam a ser incluídos na classe "Sem Diagnóstico" também.

No que diz respeito à classe "Neoplasias" seria de se esperar um maior número de casos com esse diagnóstico, principalmente tendo em conta que a idade média dos animais examinados neste casuística é de 6,9 anos (tabela 9). Visto que o curso mais comum para afecções neoplásicas são descritas para animais com idades superiores a 5 anos, era expectável que houvesse uma maior frequência absoluta de animais nesta classe. A razão pela qual apenas 3 casos (com uma frequência relativa de 2% nos 143 animais em estudo - gráficos 4 e 5) tenham sido incluídos nesta classe é que, embora surgissem vários animais em que as suspeitas clínicas recaíam nas alterações neoplásicas, em virtude de não se terem obtido diagnósticos definitivos, por não realização de MCD que confirmassem essas

suspeitas, decidiu-se que esses casos fossem incluídos na classe "Sem Diagnóstico" (Dobson, Samuel, Milstein, Rogers & Wood, 2002; Garosi, 2004; Santos, 2012).

Quando se observam as frequências da variável NúmeroMCD em ambos os grupos, "LCR" e "S/LCR", obtêm-se informações interessantes (gráficos 6 e 7). Primeiro analisamos o número de MCD realizados aos doentes pertencentes ao grupo "LCR" das classes com maiores frequências absolutas: Degenerativas e Inflamatórias (gráfico 6). No que diz respeito à classe "Degenerativas" do grupo "LCR" verifica-se que a maior parte dos doentes (11 em 12) realizaram 4 MCDs, a saber: Rx, colheita e análise de LCR, Mielografia e RM. Todos os animais dessa classe foram diagnosticados com HDIV, o que explica a realização dos exames.

Quando há suspeita de HDIV é necessário recorrer-se à imagiologia de modo a aferir exactamente qual o disco herniado e as lesões medulares envolvidas. Para isso, partindo de um simples estudo radiográfico, realizaram-se também mielografia e RM, obtendo-se, assim, uma noção tridimensional da hérnia e, caso haja, quais as lesões secundárias que resultaram da extrusão ou protusão do disco-intervertebral. Isso justifica a realização de 4 MCD em quase todos os animais desta classe. Em plena verdade, é importante referir que a colheita de LCR para casos de HDIV não é diagnóstica sem o auxílio a técnicas imagiológicas. Porém, tendo em conta que a técnica de administração do contraste mielográfico por via intra-tecal envolve a inserção de uma agulha espinhal, nestes 12 animais colheu-se LCR antes da injeção do contraste, realizando-se também a sua análise (Ross & Modic, 1992; De Haan, Shelton & Ackerman, 1993; Olby, Müntana, Sharp & Thrall, 2000; Tanaka, Nakayama & Takase, 2004; Robertson & Thrall, 2011).

Referindo-se à classe "Inflamatórias" do grupo "LCR" vê-se que a maioria dos doentes (6 em 9) foram submetidos a 2 MCD, a saber: a colheita e análise de LCR e RM (gráfico 6). Obviamente que nestes animais em que a suspeita diagnóstica cái sobre as afecções inflamatórias (infecciosas ou não) a mielografia teria menor valor diagnóstico quando comparada com a RM e com a análise do LCR, justificando esta distribuição (Dewey, Kortz & Bailey, 1998).

Focando, agora, o grupo "S/LCR", as classes em que as frequências do número de MCD são maiores são as das neuropatias "Degenerativas" e dos casos "Sem Diagnóstico" (gráfico 7). O que foi dito sobre o número de MCD realizados para a classe "Degenerativas" do grupo "LCR" aplica-se perfeitamente à classe respectiva do grupo "S/LCR". Tendo em conta que os MCD com maior valor diagnóstico para estas alterações são os exames imagiológicos, isso explica o facto de 15 em 21 cães terem sido submetidos a um estudo radiográfico, mielografia e RM (3 MCD). Nestes animais não se realizaram colheita e análise de LCR visto não terem sido obtidas as autorizações por parte dos proprietários, seja por razões económicas, ou porque decidiram que a relação custo-benefício não o justificava, ou

por ambos os motivos (De Haan, Shelton & Ackerman, 1993; Olby, Müntana, Sharp & Thrall, 2000; Tanaka, Nakayama & Takase, 2004).

No que diz respeito à classe "Sem Diagnóstico" do grupo "S/LCR" não é surpresa que a maior frequência absoluta da variável NúmeroMCD seja o 0MCD (44 em 55) (gráfico 7). Obviamente que numa classe onde estão representados os animais sem diagnóstico é de se esperar que haja um grande número de doentes que não realizaram quaisquer MCD.

Com esta informação, vendo que a frequência de animais que realizaram 4 exames, pertencentes à classe "Degenerativas" do grupo "LCR", é a mais elevada de todas, torna-se fácil compreender que a esses animais também corresponde o maior "peso" total de MCD realizados, com um PesoMCD de 10 (tabelas 10 e 11).

3.2 - Estatística comparada

Decidiu-se estudar como é que a realização da colheita e análise do LCR influencia o número de exames realizados por animal para a obtenção de um diagnóstico. Para isso, o primeiro passo foi determinar se a variável NúmeroMCD apresenta uma distribuição normal (tabela 12 e Anexo 5). Aplicou-se o teste de Kolmogorov-Smirnov onde a H_0 é de que a variável NúmeroMCD pertence a uma distribuição normal e a H_1 é que esta variável não está normalmente distribuída.

Tendo em conta que o valor de significância para esta variável é zero (significância $\leq 0,05$) então a H_0 é rejeitada, aceitando-se que o número de MCD realizados por paciente não está numa distribuição normal.

Assim sendo, realizou-se o teste estatístico não-paramétrico de Mann-Whitney U, relacionando as variáveis LCR e NúmeroMCD, avaliando se estas variáveis diferem significativamente (tabela 15 e Anexo 6).

Visto que o valor da significância assintótica é zero ($\leq 0,05$), assume-se que estatisticamente existe uma diferença no número de MCD realizados quando se efectua também a colheita e análise de LCR. Se se observar as médias do número de MCD realizados nos grupos "LCR" e "S/LCR", tendo em conta a existência ou não de diagnóstico definitivo (tabela 14), verifica-se que existe uma grande discrepância entre os valores.

Considerando apenas os casos com diagnóstico, a média do NúmeroMCD para o grupo "LCR" é 3,0 enquanto que para o grupo "S/LCR" é 1,0. Obviamente que o grupo "LCR" terá valores superiores de NúmeroMCD pela realização da colheita e análise de LCR. Contudo, mesmo que retiremos esse valor da equação, a diferença de médias continuará a ser significativo, sendo que o grupo "S/LCR" estatisticamente apresenta uma média de NúmeroMCD inferior à do grupo "LCR". Por outras palavras, aparentemente a colheita e análise de LCR não parece diminuir o número de MCD necessários para a obtenção de um diagnóstico definitivo de animais com afecções neurológicas.

Já foi referido que a maioria das neuropatias diagnosticadas são pertencentes à classe de alterações degenerativas, com principal destaque para as HDIV. Também já foi mencionado que a importância do LCR nestes casos é relativa pois, embora o LCR possa conter características anormais, essas anormalidades não são diagnósticas sendo sempre necessário recorrer-se a técnicas imagiológicas (Ross & Modic, 1992; De Haan, Shelton & Ackerman, 1993; Olby, Müntana, Sharp & Thrall, 2000; Tanaka, Nakayama & Takase, 2004; Robertson & Thrall, 2011).

A dimensão do grupo "LCR" pode ter alguma influência neste teste estatístico. Verifica-se uma percentagem de 70% de casos com diagnóstico neste grupo (gráfico 3) contra os 48% de casos diagnosticados no grupo "S/LCR" (gráfico 4). Porém, não se pode dizer que 70% em 37 (26 animais) seja estatisticamente significativo contra 48% em 106 (51 animais).

No entanto, se por um lado o diagnóstico não é obtido com um número inferior de MCD, é interessante verificar-se se os exames realizados representam um "peso" inferior caso haja a colheita e análise de LCR. Ou seja, se o "peso" dos MCD do grupo "S/LCR" com diagnóstico não for muito díspar do valor do peso dos MCD para o grupo "LCR", isso pode ser uma justificação para a análise de LCR. Para isso estudou-se, primeiramente, se a variável PesoMCD tem uma distribuição normal através do teste de normalidade de Kolmogorov-Smirnov onde a H_0 é de que a variável PesoMCD pertence a uma distribuição normal e a H_1 é que esta variável não está normalmente distribuída (tabela 13 e Anexo 5).

Visto que o valor de significância (Sig) para esta variável é zero ($\text{Sig} \leq 0,05$) então a H_0 é rejeitada, aceitando-se que o peso de MCD realizados por paciente não está numa distribuição normal.

Com isso, realizou-se o teste estatístico não-paramétrico de Mann-Whitney U, relacionando as variáveis LCR e PesoMCD, avaliando se estas variáveis diferem significativamente (tabela 17 e Anexo 6). Como o valor da significância assintótica é zero ($\leq 0,05$), assume-se que estatisticamente existe diferença no peso relativo que os MCD realizados têm quando se efectua também a análise de LCR. Se se observar a estatística sobre as médias do peso de MCD realizados nos grupos "LCR" e "S/LCR", tendo em conta a existência ou não de diagnóstico definitivo (tabela 16) verifica-se que existe uma grande diferença entre os valores.

Considerando apenas os casos com diagnóstico, a média do PesoMCD para o grupo "LCR" é 7,8 enquanto que para o grupo "S/LCR" é 4,6. É óbvio que o grupo "LCR" terá valores superiores de PesoMCD pela realização da colheita e análise de LCR. Contudo, mesmo que retiremos o valor do peso relativo da colheita e análise de LCR da equação, a diferença de médias continuará a ser significativo, sendo que o grupo "S/LCR", estatisticamente, apresenta uma média de PesoMCD inferior à do grupo "LCR". Aparentemente, a colheita e análise de LCR não parece diminuir o peso relativo que os MCD têm para a obtenção de um diagnóstico definitivo de animais com neuropatias. Por outras palavras, a realização de

análises no LCR implica maiores riscos, custos, recursos e tempo dispendido por doente, sem garantir que haja a obtenção do diagnóstico caso não se recorra a outros MCD.

Analisar o custo-benefício de procedimentos médicos é sempre algo de difícil execução, principalmente porque é impossível medir o aspecto emocional da decisão da realização ou não de certo MCD.

Outra justificação para esta disparidade de valores é o que já foi mencionado anteriormente para a variável NúmeroMCD, que a maioria das neuropatias diagnosticadas são pertencentes à classe de alterações degenerativas, principalmente as HDIV. Também já foi explicado que para estes casos o uso de métodos imagiológicos é fulcral para a obtenção do diagnóstico. E tendo em conta que para a variável PesoMCD a mielografia representa um peso individual de 3 e a RM de 4, isso explica porque que se verificam pesos tão elevados nos grupos com diagnóstico (Ross & Modic, 1992; De Haan, Shelton & Ackerman, 1993; Olby, Müntana, Sharp & Thrall, 2000; Tanaka, Nakayama & Takase, 2004; Robertson & Thrall, 2011).

Contudo, a bibliografia refere que, embora nem sempre conclusivo, a análise do LCR é uma ferramenta importante para o diagnóstico de neuropatias. Assim sendo, de modo a aferir se realmente existe alguma relevância clínica na realização da colheita de LCR para a obtenção do diagnóstico definitivo, realizou-se o teste de chi-quadrado relacionando as variáveis LCR e Dx (Di Terlizzi & Platt, 2009).

Assumindo como H_0 que a colheita e análise de LCR não facilita a determinação do diagnóstico definitivo e como Hipótese alternativa (H_1) que as variáveis estão relacionadas e que o LCR auxilia no diagnóstico de afecções do SNC, realizou-se o teste e obteve-se os resultados apresentados na tabela 18 e Anexo 7.

Neste teste, para um nível de significância (α) de 0,05 ou intervalo de confiança de 95%, obteve-se um valor $p^{18} = 0,020$, sendo que $p \leq 0,05$. Assim sendo, rejeita-se a H_0 , aferindo-se que a colheita e análise de LCR é uma ferramenta diagnóstica complementar no diagnóstico de neuropatias.

Com base na bibliografia estudada este resultado não é de difícil compreensão. O LCR sofre diversas alterações no decorrer de neuropatias devido à lesão das BHE/BSLCR e devido à estimulação tecal para produção de imunoglobulinas, entre outras causas. Deste modo afere-se que, embora inconclusivo para algumas afecções, a colheita e análise do LCR tem importância diagnóstica para afecções do SNC do cão (Bichsel et al., 1984; Tipold et al., 1993; Tipold, 1995; Wilson & Oehninger, 2007; Di Terlizzi & Platt, 2009; Wolburg & Paulus, 2010).

¹⁸ O valor de p representa a probabilidade de se obter uma estatística de teste pelo menos tão extrema como a que foi realmente observada, assumindo que a H_0 é verdadeira (Goodman, 1999).

3.3 - Alterações do LCR e as suas respectivas classes

No que concerne à informação obtida nas análises realizadas aos LCR colhidos é interessante verificar se as alterações observadas estão de acordo com o que a bibliografia pesquisada refere para cada classe de diagnóstico referida previamente.

Relativamente ao descrito para as alterações vasculares só foi observado um caso (tabela 19). Os parâmetros CTC, CDx e proteína estão de acordo com o descrito. Vários autores descrevem que em alterações vasculares o LCR geralmente apresenta-se xantocrômico, porém, podem não ocorrer quaisquer alterações no líquido e este apresentar-se límpido e incolor, como neste caso. (Olby, 2004; Wamsley & Alleman, 2004; De Risio, 2012).

Na classe das afecções inflamatórias (tabela 20) é onde existe uma maior disparidade de observações. Exceptuando-se os dois animais diagnosticados com esgana onde todas as alterações no LCR são as expectáveis de acordo com a pesquisa bibliográfica, nas outras afecções foram observados alguns parâmetros que não vão de encontro com a revisão realizada (Alleman et al., 1992; Abate et al., 1998; Amude et al., 2006a; Amude et al., 2007; Di Terlizzi & Platt, 2009; Wood et al., 2012).

No que diz respeito ao caso onde foi diagnosticado Neosporose, todos os parâmetros observados estão de acordo com o esperado excepto o teste de Pandy. O previsto numa infecção protozoária é que haja um aumento das concentrações de IgG e de IgM, resultando num teste de Pandy positivo contudo, neste caso, observou-se um resultado negativo (Bichsel et al., 1984; Tipold et al., 1993; Tipold, 1995; Vernau, 2000; Di Terlizzi & Platt, 2009; Garosi et al., 2010; Nghiem & Schatzberg, 2010; Lorenzs et al., 2011a; Wood et al., 2012). Esta negatividade pode estar relacionada com erros técnicos durante a realização do teste, seja por utilização de reagente de Pandy insuficiente, como por uso de uma amostra de LCR muito escassa. A própria sensibilidade deste teste é uma limitação do seu uso visto que aumentos muito ténues de Ig podem ser indetectáveis (Coles, 1979; Meyer et al., 1992; Desnoyers et al., 2008).

Nos três casos diagnosticados como MARC é interessante ver como os resultados do LCR de dois deles contêm discrepâncias comparando com os parâmetros expectáveis. No primeiro caso verificou-se que, aquando da punção lombar, surgiu sangue no canhão da agulha lombar. Isso obviamente pode ser devido a hemorragia iatrogénica ou a hemorragia patológica. Depois de alguns segundos notou-se que o fluído retomou o seu aspecto límpido e translúcido à medida que ia sendo colectado na seringa. Mesmo assim, a amostra total que foi utilizada para amostra manteve esse aspecto macroscópico. Contudo, durante o CDx observou-se a presença de eritrofagocitose. A bibliografia refere que esse sinal é indicativo de hemorragias patológicas, levantando algumas dúvidas com relação à causa do aparecimento de sangue aquando da punção. Este paciente realizou, posteriormente, RM onde foi descartada a presença de qualquer tipo de hemorragia, e confirmando-se a presença de uma alteração inflamatória (Rakich & Latimer, 2003).

No segundo caso, o único parâmetro que se enquadra com a revisão bibliográfica é a CTC, que se encontra aumentada. Porém, tanto o CDx e o teste de Pandy fogem do que seria de se esperar. A pleocitose característica da MARC é formada maioritariamente por uma população de polimorfonucleares neutrófilos. No entanto, neste caso, verifica-se uma pleocitose mononuclear. Alguns autores referem que, por vezes, esta pleocitose pode ser observada na MARC, contudo, ela é comumente vista em afecções como a MEG ou infecções virais (Cizinauskas et al., 2000; Gandini, et al., 2003; Tipold, 2003; Kiš et al., 2008; Di Terlizzi & Platt, 2009; Lowrie et al., 2009; Tipold & Schatzberg, 2010). Do mesmo modo, o teste de Pandy para esta afecção espera-se que apresente positividade; o que não se verifica de todo. Tendo em conta as alterações encontradas neste líquido o que justifica este diagnóstico são outras variáveis que nada têm a ver com o LCR: a saber a raça e a idade do animal e o quadro clínico apresentado. Este doente era um canídeo de raça Beagle, com dois anos de idade, que se apresentou à consulta com hiperestesia e dor cervical. O LCR deste doente apresenta alterações citológicas típicas de MARC crónica o que, associado à sintomatologia e as características do animal, levaram-nos a crer que se tratava de MARC (também denominada de Síndrome da dor do Beagle) (Albassam, Houston, Greaves & Barsoum, 1989; Hayes, Roberts & Halliwell, 1989; Tipold et al., 1993; Snyder et al., 1995; Platt, 2004).

Sobre os três casos com diagnóstico de MEG, dois deles apresentaram as alterações mais comumente descritas, sendo que no terceiro caso o teste de Pandy foi negativo, quando seria de esperar um aumento das proteínas totais e da IgG (Tipold et al., 1993; Tipold, 1995; Thomas, 1998; Suzuki et al., 2003). O mesmo que foi dito aquando do caso de Neosporose quanto ao teste de Pandy aplica-se neste doente. A negatividade pode estar associada com erros técnicos durante a realização do teste de Pandy, seja por utilização de reagente insuficiente, como por uso de uma amostra de LCR muito escassa. A própria sensibilidade do teste pode limitar o seu uso visto que aumentos muito ténues de Ig podem ser indetectáveis (Coles, 1979; Meyer et al., 1992; Desnoyers et al., 2008).

As anomalias diagnosticadas (tabela 21) têm como consequências compressões cerebrais e/ou medulares. Assim, é mais provável encontrar-se as alterações que ocorrem em qualquer processo compressivo, observando-se um aspecto macroscópico dito normal, com o LCR límpido e translúcido, com CTCs normais, ou ligeiramente aumentadas e pleocitoses mononucleares, e com concentrações proteicas geralmente elevadas. Exceptuando-se o LCR com contaminação sanguínea, os outros casos enquadram-se no que a bibliografia descreve sobre as alterações espectáveis. Novamente, o teste de Pandy foi negativo em todos os casos e embora seja mais comum um ligeiro aumento das concentrações proteicas em compressões destas naturezas, também são descritos valores normais para as concentrações de proteína (Vandeveldel & Spano, 1977; Bohn et al., 2006; Windsor et al.,

2008; DiTerlizzi, 2009; Lorenz, 2011; Marcos & Santos, 2011; Srugo, 2011; Wood et al., 2012).

No que diz respeito às alterações degenerativas (tabela 22) é descrito que os LCR de animais com hérnias discais apresentem LCR límpidos e transparentes, com CTCs normais ou ligeiramente aumentadas e pleocitoses variáveis (as mais comuns a mononuclear e a neutrofílica, podendo ocorrer mistas) (Vandeveldel & Spano, 1977; Bohn et al., 2006; Windsor et al., 2008; DiTerlizzi, 2009; Lorenz, 2011; Marcos & Santos, 2011; Srugo, 2011; Wood et al., 2012). Isso verifica-se em todos os casos com a única exceção do animal onde durante a colheita ocorreu contaminação sanguínea. Isso justifica a xantocromia do LCR e também a positividade do teste de Pandy. Tendo em conta as proteínas, está descrito que nestes casos as proteínas totais estão elevadas, principalmente devido ao aumento da concentração de IgG (Bichsel et al., 1984; Tipold et al., 1993). Porém, isso só foi observado em dois casos, um deles devido à contaminação sanguínea. No animal onde se verificou a xantocromia, não se quantificou os níveis de IgG nem no LCR, nem no sangue, devido que não se sabe se este aumento se deve pela produção intratecal ou simplesmente contaminação com as Ig do sangue circulante. A negatividade do teste de Pandy pode ser explicada pela sensibilidade do teste em si, sendo que aumentos ligeiros podem não ser detectáveis. Outro motivo a ponderar é que na bibliografia predomina a referência a aumentos dos níveis proteicos mas, alguns autores referem que valores dentro da normalidade também são comuns, o que pode ser o caso nestes doentes (Coles, 1979; Meyer et al., 1992; Wamsley & Alleman, 2004; Desnoyers et al., 2008; Wood et al., 2012).

4 - Conclusão

O diagnóstico de afecções neurológicas pode ser um desafio. Entre lesões degenerativas, inflamatórias, vasculares, neoplásicas, e muitas mais, para além de uma correcta neurolocalização através de um minucioso exame neurológico, é essencial um bom plano diagnóstico. Para isso, é preciso avaliar-se o custo-benefício e o risco de todos os MCD disponíveis, minimizando o número e o peso relativo que cada MCD tem, mas visando sempre obter-se um diagnóstico definitivo, o seu prognóstico e um tratamento adequado.

Sabe-se que animais com lesões neurológicas nem sempre apresentam LCR com características anormais, do mesmo modo que a etiologia da neuropatia influencia grandemente as possíveis alterações do líquido. Ou seja, o LCR de doentes com sinais óbvios de uma afecção neurológica pode apresentar características dentro da normalidade ou alterações inconclusivas. Por exemplo, lesões degenerativas podem ter como consequência um LCR que, em si, não fornece informações diagnósticas da afecção, sendo sempre necessário recorrer-se a uma, ou mais, técnicas imagiológicas.

Concluiu-se que, em doentes com neuropatias, a realização da colheita e análise de LCR não diminui nem o número nem o peso dos MCD presentes no plano diagnóstico do animal. A análise do LCR, *per si*, não é suficiente para a obtenção de um diagnóstico definitivo, sendo necessário o recurso a outros MCD. Contudo, isso não torna a colheita e a análise do LCR inúteis como ferramenta diagnóstica. Verificou-se que existe uma relação positiva significativa entre a obtenção de diagnóstico e a colheita de LCR. A discussão dos sinais encontrados nos 37 LCR colhidos são exemplo de que a informação do LCR pode ser importante. Se, por um lado, por vezes o LCR é apenas assertivo quanto à presença de uma afecção no SNC, mas não de sua etiologia, por outro lado, em outros casos, a análise do LCR pode ajudar a direccionar o plano diagnóstico, auxiliando e proporcionando a escolha de exames mais específicos e sensíveis.

Com isso, conclui-se que a colheita e análise do LCR, embora não seja uma ferramenta diagnóstica infalível e 100% conclusiva, é um MCD que auxilia na exclusão de possíveis causas das alterações neurológicas observadas, direccionando e facilitando o raciocínio crítico do MV para a obtenção de um diagnóstico definitivo, para além de poder servir como método de aferição sobre se a terapêutica escolhida está a ser eficaz no tratamento de neuropatias.

Bibliografia

- Abate, O., Bollo, E., Lotti, D. & Bo, S. (1998). Cytological, immunocytochemical and biochemical cerebrospinal fluid investigations in selected central nervous system disorders of dogs. *Infusionstherapie transfusionsmedizin*, 45(2), 73–85.
- Albassam, M. A., Houston, B. J., Greaves, P. & Barsoum, N. (1989). Polyarteritis in a beagle. *Journal of the american veterinary medical association*, 194(11), 1595–1597.
- Alberts, B., Jonhson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. & Walter, P. (Eds.) (2002). Manipulating proteins, DNA, and RNA: fractionation of cells. In Alberts, B., Jonhson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. & Walter, P. (Eds.) *Molecular biology of the cell* (4^a Edição, pp 485). New York, USA: Garland Science, Taylor & Francis Group.
- Aldred, A. R., Brack, C. M. & Schreiber, G. (1995). The cerebral expression of plasma protein genes in different species. *Comparative biochemistry and physiology. Part B, Biochemistry & molecular biology*, 111(1), 1-15.
- Alleman, A. R., Christopher, M. M., Steiner, D. A. & Homer, B. L. (1992). Identification of intracytoplasmic inclusion bodies in mononuclear cells from the cerebrospinal fluid of a dog with canine distemper. *Veterinary pathology*, 29(1), 84–5.
- Amude, A. M., Alfieri, A. A. & Alfieri, A. F. (2006a). The nervous form of canine distemper. *Veterinária e Zootecnia*, 125–136.
- Amude, A. M., Alfieri, A. A. & Alfieri, A. F. (2006b). Antemortem diagnosis of CDV infection by RT-PCR in distemper dogs with neurological deficits without the typical clinical presentation. *Veterinary research communications*, 30, 679–687.
- Amude, A. M., Alfieri, A. A. & Alfieri, A. F. (2007). Clinicopathological findings in dogs with distemper encephalomyelitis presented without characteristic signs of the disease. *Research in veterinary science*, 82, 416–422.
- Banks, W. J. (Ed.) (1993). Nervous tissue. In W. J. Banks (Ed.) *Applied veterinary histology*. (3^a Edição, pp 218). Baltimore, USA: Williams & Wilkins.
- Baronne, R. (Ed.) (1966). Tête osseuse dan son ensemble. B - Conformation intérieur: Cavité crânienne. In Baronne, R. (Ed.) *Anatomie comparée des mammifères domestiques. Tome I Osteologie* (pp 243). Lyon, France: Laboratoire d'anatomie; Ecole nationale veterinaire Lyon.
- Barone, R. (Ed.) & Bortolami, R. (2004). Système nerveux centrale. In Barone, R (Ed.) *Anatomie comparée des mammifères domestiques. Tome 6: Neurologie I* (3^a Edição). Paris, France: Vigot Freres, Editeurs.
- Bailey, C. S. & Higgins, R.J. (1985). Comparison of total white blood cell count and total protein content of lumbar and cisternal cerebrospinal fluid of healthy dogs. *American journal of veterinary research*, Maio 46(5), 1162–1165.
- Bailey, C. S. & Vernau, W. (1997). Cerebrospinal fluid. In Kaneko, J. J., Harvey, J. W. & Bruss, M. L. (Eds.) *Clinical biochemistry of domestic animals* (5^a Edição, pp 786 - 822). USA: Academic Press.
- Bauer, N. B., Bassett, H., O'Neill, E. J. & Acke, E. (2006). Cerebrospinal fluid from a 6-year-old dog with severe neck pain. *Veterinary clinical pathology*, 35(1), 123–125.

- Beckman Coulter, Inc. (2010). Chemistry Information Sheet A18528 AF, Beckman Coulter Ireland Inc.
- Behr, S., Trumel, C., Cauzinille, L., Palenché, F. & Braun, J. P. (2006). High resolution protein electrophoresis of 100 paired canine cerebrospinal fluid and serum. *Journal of veterinary internal medicine / American college of veterinary internal medicine*, 20(3), 657–62.
- Bennett, P. F., Allan, F. J., Guilford, W. G., Julian, A. F. & Johnston, C. G. (1997). Idiopathic eosinophilic meningoencephalitis in rottweiler dogs: three cases (1992-1997). *Australian veterinary journal*, 75 (11), 786 - 789.
- Bergman, L. R. (2006). Chapter 51 - Miscellaneous spinal cord diseases. In August, J. R. (Ed.) *Consultations in feline internal medicine - volume 5* (5ª Edição, pp. 473 - 476). St. Louis, Missouri, USA: Elsevier Saunders.
- Bienzle, D., McDonnell, J. J. & Stanton, J. B. (2000). Analysis of cerebrospinal fluid from dogs and cats after 24 and 48 hours of storage. *Journal of the american veterinary medical association*, 216(11), 1761–4.
- Bichsel, P., Vandeveld, M., Vandeveld, E., Affolter, U. & Pfister, H. (1984). Immunoelectrophoretic determination of albumin and IgG in serum and cerebrospinal fluid in dogs with neurological diseases. *Research in veterinary science*. 37(1):101-7.
- Bohn, A., Wills, T., West, C., Tucker, R. & Bagley, R. (2006). Cerebrospinal fluid analysis and magnetic resonance imaging in the diagnosis of neurologic disease in dogs: a retrospective study. *Veterinary clinical pathology / American Society for Veterinary Clinical Pathology*, 35(3), 315–20.
- Boogerd, W., Vroom, T. M., van Heerde, P., Brutel de la Riviere, G., Peterse, J. L. & van der Sande, J. J. (1988). CSF cytology versus immunocytochemistry in meningeal carcinomatosis. *Journal of neurology, neurosurgery & psychiatry*, 51(1), 142–145.
- Bradley, W. G., Daroff, R. B., Fenichel, G. M. & Jankovic, J. (2004). Laboratory investigations in diagnosis and management of neurological disease. In Bradley, W. G., Daroff, R. B., Fenichel, G. M. & Jankovic, J. (Eds.) *Neurology in clinical practice, the neurological disorders, volume 1* (4ª Edição, pp 461). Philadelphia, USA: Butterworth Heinemann - Elsevier, Inc
- Braund, K. G. (Ed.) (1986). Diagnostics techniques: Cerebrospinal fluid collection techniques and interpretation. In Braund, K. G. (Ed.) *Clinical syndromes in veterinary neurology* (pp 2133 - 217). Baltimore, USA: Williams & Wilkins.
- Breasted J. H. (1992). Neurosurgery in Antiquity - The Edwin Smith surgical papyrus. In Wilkins, R.H. (Ed.) *Neurosurgical classics. American association of neurological surgeons*. (pp 1). USA: American Association of Neurological Surgeons.
- Burgener, I., Van Ham, L., Jaggy, A., Vandeveld, M. & Tipold, A. (1998). Chemotactic activity and IL-8 levels in the cerebrospinal fluid in canine steroid responsive meningitis–arteriitis. *Journal of neuroimmunology*, 89(1–2), 182–190.
- Burkitt, H. G., Young, B. & Heath, J. W. (Eds.) (1994). Tecidos nervosos. In H. G. Burkitt, B. Young & J. W. Heath (Eds.) *Wheater histologia funcional* (3ª Edição, pp 134 - 135). Rio de Janeiro, Brasil: Editora Guanabara Koogan S.A.

- Buser, P. & Imbert, M. (Eds.) (1975). Chapitre V - mécanisme nerveux des principales régulations végétatives. In Buser, P. & Imbert, M. (Eds.) *Neurophysiologie fonctionnelle* (pp 339 - 340). Paris: Hermann.
- Cauzinille, L. (2007). Bases neuro-anatomo-physiologiques et sémiologiques. In Cauzinille, L. (Ed.), *Neurologie clinique du chien et du chat* (2^a Edição; pp 7 - 9). Rueil-Malmaison, France: Editions du Point Vétérinaire.
- Cellio, B. C. (2001). Collecting, processing, and preparing cerebrospinal fluid in dogs and cats. *Compendium, continuing education for veterinarians*, 23(9), 786–793.
- Chrisman, C. L. (Ed.) (1985). Investigações auxiliares especiais. In Chrisman, C. L. *Neurologia dos pequenos animais* (pp 63 - 96). São Paulo: Roca.
- Chrisman, C. L. (Ed.) (1991). Introduction to the nervous system. In: Chrisman, C. L. (Ed.) *Problems in small animal neurology* (2^a Edição, pp 24). Pennsylvania, USA: Lea & Febiger.
- Christopher, M. M., Perman, V. & Hardy, R.M. (1988). Reassessment of cytologic values in canine cerebrospinal fluid by use of cytocentrifugation. *Journal of the american veterinary medical association*, Jun 15; 192(12):1726-9.
- Cizinauskas, S., Jaggy, A. & Tipold, A. (2000). Long-term treatment of dogs with steroid-responsive meningitis-arteritis: clinical, laboratory and therapeutic results. *Journal of small animal practice*, 41, 295–301.
- Clutton, R. E. (1999). Anaesthetic equipment. In: Seymour, C. & Gleed, R. (Eds.) *BSAVA Manual of small animal anaesthesia and analgesia* (pp 38). UK: British Small Animal Veterinary Association.
- Coates, J. R. (2004). Paraparesis. In Platt, R. S. & Olby, N. J. (Eds.) *BSAVA manual of canine and feline neurology* (3^a Edição, pp 243 - 247). Gloucester, UK: British Small Animal Veterinary Association.
- Colaço, B., Ferreira, D., Gonzalo-Ordén, M. & Lacilla, J. M. V. (2003). A aplicação da ressonância magnética no estudo anatômico do encéfalo dos cães. *Revista portuguesa de ciências veterinárias*, 98(548), 159 - 165.
- Coles, E. H. (Ed.) (1979). Liquide céphalo-rachidien. In Coles, E. H. (Ed.), Lapeire, C. & Crestian, J. (Tr.) *Le laboratoire en clinique vétérinaire* (pp 416 - 424). Paris, France: Editions Vigot.
- Cohn, L. A. (1997) Glucocorticosteroids as immunosuppressive agents. *Seminars in Veterinary Medicine and Surgery*, 12(3):150-156.
- Cook, J. R. & DeNicola, D. B. (1988). Cerebrospinal fluid. *The Veterinary clinics of North America. Small animal practice*, 18(3), 475-499.
- Cunningham, J. G. (Ed.) (1997). Section II - Neurophysiology. In Cunningham, J.G. (Ed.) *Textbook of veterinary physiology* (2^a Edição; capítulo 14, pp 108 - 112). Pennsylvania, USA: W.B. Saunders Company.
- Cutler, R. W. & Spertell, R. B. (1982). Cerebrospinal fluid: a selective review. *Annals of neurology*, 11(1), 1–10.
- Damkier, H. H., Brown, P. D. & Praetorius, J. (2010). Epithelial pathways in choroid plexus electrolyte transport. *Physiology*, 25(4), 239-49.

- Dawson, B., Michenfelder, J. B. & Theye, R. A. (1971). Effects of ketamine on canine cerebral blood flow and metabolism: Modification by prior administration of thiopental. *Anesthesia & Analgesia*, 50:443-447.
- Debiasi, R. L. & Tyler, K. L. (2004). Molecular methods for diagnosis of viral encephalitis. *Clinical microbiology reviews*, 17(4), 904–925.
- De Haan, J. J., Shelton, S. B., & Ackerman, N. (1993). Magnetic resonance imaging in the diagnosis of degenerative lumbosacral stenosis in four Dogs. *Veterinary surgery*, 22(1), 1–4.
- DeLahunta, A (2009). Cerebrospinal fluid and hydrocephalus. In A. DeLahunta, E. Glass (Eds.), *Veterinary neuroanatomy and clinical neurology* (3ª Edição; pp 54). St. Louis, Missouri, USA: Saunders, an imprint of Elsevier Inc.
- Del Bigio, M. R. (2010). Ependymal cells: biology and pathology. *Acta neuropathologica*, 119(1), 55-73.
- De Risio, L. (2012). Ischaemic myelopathy. In Platt, S. R., & Garosi, L. S. (Eds.). *Small animal neurological emergencies* (pp 333 - 340). London, UK: Manson Publishing Ltd.
- Dellmann, H. D. & Carithers, J. R. (Eds.) (1996). Nervous tissue. In Dellmann, H. D. & Carithers, J. R. (Eds.), *Cytology and microscopic anatomy* (pp 141 - 160). Pennsylvania, USA: Williams & Wilkins.
- Dellmann, H. D. & Mc Clure, R. G. (1986). Sistema nervoso central. In R. Getty (Ed) *Sisson e Grossman's A anatomia dos animais domésticos* (5ª Edição, pp 186 - 206). Rio de Janeiro, Brasil: Editora Guanabara Koogan S.A.
- Desnoyers, M., Bédard, C., Meinkoth (Ed.), J. H. & Crystal, M. A. (2008). Cerebrospinal fluid analysis. In Cowell, R. L., Tyler, R. D., Meinkoth, J. H. & DeNicola, D. B. (Eds.), *Diagnostic cytology and hematology of the dog and cat* (3ª Edição, pp 215 - 232). Missouri, USA: Mosby Elsevier Inc.
- Detweiler, D. K. (1989). Regional and fetal circulations. In Swenson, M. (Ed.), *Duke's physiology of domestic animals* (10ª Edição, pp 197 - 198). New York, USA: Cornell University Press.
- Dewey, C. W., Kortz, G. D. & Bailey, C. S. (1998). Spinal epidural empyema in two dogs. *Journal of the american animal hospital association*, 34(4) 305-308.
- DiaSys Diagnostic Systems GmbH (2008). Albumin in Urine/CSF FS. *DiaSys Diagnostic Systems GmbH*. Alte Strasse 9 65558 Holzheim Germany.
- Dickinson, P. J., Sturges, B. K., Kass, P. H. & LeCouteur, R. A. (2006). Characteristics of cisternal cerebrospinal fluid associated with intracranial meningiomas on dogs: 56 cases (1985-2004). *Journal of the american veterinary medical association*, 228 (4), 564 - 567.
- Dimas, L. F. & Puccioni-Sohler, M. (2008). Exame do líquido cefalorraquidiano: influência da temperatura , tempo e preparo da amostra na estabilidade analítica. *Jornal brasileiro de patologia e medicina laboratorial*, 44(2), 97–106.
- Di Terlizzi, R., & Platt, S. R. (2009). The function, composition and analysis of cerebrospinal fluid in companion animals: Part II: Analysis. *The veterinary journal*, 180(1), 15-32.

- Dobson, J. M., Samuel, S., Milstein, H., Rogers, K. & Wood, J. L. N. (2002). Canine neoplasia in the UK: estimates of incidence rates from a population of insured dogs. *The Journal of small animal practice*, 43(6), 240–6.
- Ducoté, J. M. & Dewey, C. W. (Ed.) (2008). Neurodiagnostics. In Dewey, C. W. (Ed.) *A practical guide to canine and feline neurology* (2ª Edição, pp 75 - 81). Iowa, USA: Wiley-Blackwell.
- Dreifus, C. (2009, Janeiro 26). A conversation with Peter Agre: using a leadership role to put a human face on science. *The new york times*, p D2.
- Duncan, J. R., Oliver, Jr., J. E. (Ed.) & Mayhew, I. G. (Ed.) (1987). Laboratory examinations. In Oliver, Jr., J.E., Hoerlein, B. F. & Mayhew, I. G. (Eds.) *Veterinary neurology* (pp 57 - 64). Philadelphia, USA: W.B. Saunders Company.
- Dyken, P. R., Shirley, S., Trefz, J. & El Gammal, T. (1980). Comparison of cyto centrifugation and sedimentation techniques for CSF cytology. *Acta cytologica*, 24(2): 167-70.
- Eeg-Olofsson, O., Link, H. & Wigertz, A. (1981). Concentrations of CSF proteins as a measure of blood brain barrier function and synthesis of IgG within the CNS in "normal" subjects from age of 6 months to 30 years. *Acta pædiatrica*, 70(2), 167–170.
- Ernst, S. A., Palacios, J. R. & Siegel, G. J. (1986). Immunocytochemical localization of Na⁺, K⁺-ATPase catalytic polypeptide in mouse choroid plexus. *Journal of histochemistry cytochemistry*, 34: 189 –195.
- Evans, H. E. & DeLahunta, A. (2010a). The nervous system. In Evans, H. E., DeLahunta, A. (Eds.), *Guide to the dissection of the dog* (7ª Edição, pp 271 - 275). St. Louis, Missouri, USA: Saunders Elsevier.
- Evans, H.E. & DeLahunta, A. (2010b). The nervous system. In Evans, H.E., DeLahunta, A. (Eds.), *Guide to the dissection of the dog* (7ª Edição, pp 271 - 275). St. Louis, Missouri, USA: Saunders Elsevier.
- Fankhauser, R. (1962). The cerebrospinal fluid. In Innes, J. R. M. & Saunders, L. Z. (Eds.), *Comparative neuropathology* (pp 21 - 25). New York, USA: Academic Press.
- Feldman, B. F. (1997). Cerebrospinal fluid. In Kaneko, J. J. (Ed.) *Clinical biochemistry of domestic animals*. (5ª Edição pp 786 - 822). San Diego: Academic, 1997.
- Finger, S. (Ed.) (1994). The brain in antiquity. In S. Finger (Ed.), *Origins of neuroscience: a history of explorations into brain function* (pp 3). New York, USA: Oxford University Press, Inc. Acedido em Mai. 16, 2012, from: <http://books.google.pt/books>
- Fishman, R., Ransohoff, J. & Osserman, E. F. (1958). Factors influencing the concentration gradient of protein in cerebrospinal fluid. *The Journal of clinical investigation*, 37(10), 1419-24.
- Fishman, R. (1964). Carrier transport of glucose between blood and cerebrospinal fluid. Legacy content: *american journal of physiology*, 206(4), 836-844.
- Fletcher, T. F. (1998). Nervous tissue. In Dellman, H. D. & Eurell, J. (Eds.), *Textbook of veterinary histology* (5ª Edição, pp 91 - 113). Pennsylvania, USA: Williams & Wilkins.

- Fletcher, T. F. (2006). *Lab 3 – Brain gross anatomy*. Acedido em Mai. 21, 2012, disponível em: <http://vanat.cvm.umn.edu/neurLab3/index.html>
- Fletcher, T. F. (2013). Spinal cord and meninges. In Evans, H. E. & DeLahunta, A. (Eds.), *Miller's anatomy of the dog* (4ª Edição, pp 589 - 609). Missouri, EUA: Elsevier Inc.
- Forterre, S., Raila, J., Forterre, F., Brunnberg, L. & Schweigert, F. J. (2006). Characterisation of transthyretin and retinol-binding protein in plasma and cerebrospinal fluid of dogs. *Veterinary journal*, 171(3), 451-5.
- Freeman, K. (2005). Laboratory evaluation of cerebrospinal fluid. In Villiers, E. & Blackwood, L. *BSAVA Manual of canine and feline clinical pathology* (2ª Edição, pp 373 - 380). Gloucester, UK: British Small Animal Veterinary Association.
- Frisk, A. L., Konig, M., Moritz, A. & Baumgartner, W. (1999). Detection of canine distemper virus nucleoprotein RNA by reverse transcription-PCR using serum, whole blood, and cerebrospinal fluid from dogs with distemper. *Journal of clinical microbiology*, 37(11), 3634–3643.
- Fry, M. M., Vernau, W., Kass, P. H. & Vernau, K. M. (2006). Effects of time, initial composition, and stabilizing agents on the results of canine cerebrospinal fluid analysis. *Veterinary clinical pathology*, 35(1), 72–77.
- Fujita, Y., Mori, I. & Kitano, S. (1983). Color reaction between pyrogallol red-molybdenum (VI) complex and protein. *Bunsaki Kagaku*, 32:E379 E386.
- Fuller, G. N. & Burger, P. C. (2007). Central nervous system. In Mills, S.E. (Ed.), *Histology for pathologists* (3ª Edição, pp 273 - 319). Philadelphia, USA: Lippincott Williams & Wilkins, a Wolters Kluwer business.
- Furr, M. (Ed.) & Andrews, F. (2008). Cerebrospinal fluid and the blood–brain barrier. In M. Furr & S. Reed (Eds.), *Equine neurology* (pp 33). Ames, Iowa 50014, USA: Blackwell Publishing.
- Gandini, G., Brini, E., Belloti, D. & Cipone, M. (2003). Clinical and clinicalpathologic findings in three dogs with steroid-responsive meningitis-arteritis (SRMA). *Veterinary research communications*, 27 suppl(1), 763-765.
- Garosi, L. (2004). Lesion localization and differential diagnosis. In Platt, R. S. & Olby, N. J. (Eds.) *BSAVA manual of canine and feline neurology* (3ª Edição, pp 33). Gloucester, UK: British Small Animal Veterinary Association.
- Garosi, L., Dawson, A., Couturier, J., Matiasek, L., De Stefani, A., Davies, E., Jeffery, N. & Smith, P. (2010). Necrotizing cerebellitis and cerebellar atrophy caused by neospora caninum Infection: magnetic resonance imaging and clinicopathologic findings in seven dogs. *Journal of veterinary internal medicine*, (24), 571–578.
- Gentilini, F., Dondi, F., Mastroilli, C., Giunti, M., Calzolari, C., Gandini, G., Mancini, D. & Bergamini, P. F. (2005). Validation of a Human Immunoturbidimetric Assay to Measure Canine Albumin in Urine and Cerebrospinal Fluid. *Journal of veterinary diagnostic investigation*, 17(2), 179-183.
- Glantz, M. J., Cole, B. F., Glantz, L. K., Cobb, J., Mills, P., Lekos, A., Walters, B. C. & Recht, L. D. (1998). Cerebrospinal fluid cytology in patients with cancer: minimizing false-negative results. *Cancer*, 82(4), 733–9.

- Goodman, S. N. (1999). Toward evidence-based medical statistics. 1: the *p* value fallacy. *Annals of internal medicine*, 130(12), 995–1004.
- Gomes, F., Gama, V., Oliveira, F. S. D., Guimarães, G. C., Rosato, P. N. & Santana, Á. E. (2009). Colheita de líquido cefalorraquidiano em cães: modificação de técnica prévia Cerebrospinal fluid collection in dogs: modification of previous technique. *Semina: Ciências Agrárias, Londrina*, 30(2), 457-460.
- Gonçalves, R., Anderson, T. J., Innocent, G. & Penderis, J. (2010). Effect of seizures on cerebrospinal fluid analysis in dogs with idiopathic epilepsy. *Veterinary record*, (166), 496–498.
- Goodman, R. A, Hawkins, E. C., Olby, N. J., Grindem, C. B., Hegarty, B. & Breitschwerdt, E. B. (2003). Molecular identification of Ehrlichia ewingii infection in dogs: 15 cases (1997-2001). *Journal of the american veterinary medical association*, 222(8), 1102–7.
- Greene, C. E. & Oliver Jr, J. E. (1983). Neurologic examination. In Ettinger, S. (Ed.) *Textbook of veterinary internal medicine - diseases of the dog and cat* (2ª Edição, pp 453 - 459). USA: Saunders Company.
- Guyton, A. C. & Hall, J. E. (Eds.) (2000). Chapter 61: Cerebral blood flow; the cerebrospinal fluid; and brain metabolism. In Guyton, A. C. & Hall, J. E. (Eds.) *Textbook of medical physiology* (10ª Edição, pp 709 - 715). Philadelphia, USA: Saunders Company.
- Hayes, T. J., Roberts, G. K. & Halliwell, W. H. (1989). An idiopathic febrile necrotizing arteritis syndrome in the dog: beagle pain syndrome. *Toxicologic pathology*, 17(1 Pt 2): 129-37.
- Heick, H. M. C., Bégin-Heick, N., Acharya, C. & Mohammed, A. (1980). Automated determination of urine and cerebrospinal fluid proteins with coomassie brilliant blue and the abbott ABA-100. *Clinical biochemistry*, 13(2), 81-83.
- Hoerlein, B. F. (Ed.) & Gage, E. D. (1978). Part six: Chapter 21 - Hydrocephalus. In Hoerlein, B. F. (Ed.) *Canine neurology diagnosis and treatment* (3ª Edição, pp 733 - 736). Philadelphia, USA: Saunders Company.
- Hutchison, A. S. & Paterson, K. R. (1988). Collecting urine for microalbumin assay. *Diabetic medicine*, 5(6), 527-532. Blackwell Publishing Ltd.
- Indrieri, R. J., Holliday, T. A. & Keen, C. L. (1980). Critical evaluation of creatine phosphokinase in cerebrospinal fluid of dogs with neurologic disease. *American journal of veterinary research*, 41(8), 1299–1303.
- Jacobs, R. M., Cochrane, S. M., Lumsden, J. H. & Norris, a M. (1990). Relationship of cerebrospinal fluid protein concentration determined by dye-binding and urinary dipstick methodologies. *The canadian veterinary journal/ La revue vétérinaire canadienne*, 31(8), 587-8.
- Jaderlund, K. H., Bergstrom, K., Egenvall, A. & Hedhammar, A. (2009). Cerebrospinal fluid PCR and antibody concentrations against Anaplasma phagocytophilum and Borrelia burgdorferi sensu lato in dogs with neurological signs. *Journal of veterinary internal medicine*, (23), 669–672.
- Jaggy, A. (Ed.) (2010). Principles of neuropathology: investigation of the cerebrospinal fluid (CSF). In Jaggy, A. & Platt, S (Eds) *Small animal neurology an illustrated text* (pp 53 - 55). Hannover, Deutschland: Schlütersche Verlagsgesellschaft mbH & Co.

- Jalal, S., Nord, C. E., Lappalainen, M. & Evengard, B. (2004). Rapid and sensitive diagnosis of *Toxoplasma gondii* infections by PCR. *Clinical microbiology and infection*, 10, 922–950.
- Jenkins, T. W. (Ed.) (1972). Meninges and cerebrospinal fluid. In Jenkins, T. W. *Functional mammalian neuroanatomy* (pp 78 - 87). Philadelphia USA: Lea & Febiger.
- Johnson, A. M. (2001). Amino acids and proteins. In Burtis, C. A., Ashwood, E. R. & Bruns, D. E. (Eds.) *Tietz fundamentals of clinical chemistry* (6^a Edição, pp 309 - 316). Missouri, USA: Saunders Elsevier Inc.
- Johnson, J. A. & Lott, H. A. (1978). Standardization of the Coomassie Blue method for cerebrospinal fluid proteins. *Clinical chemistry* Nov 24 (11):1931-3.
- Johnston, M. & Papaiconomou, C. (2002). Cerebrospinal fluid transport: a lymphatic perspective, *News physiology science*, (17), 227-230.
- Jones, J. C., Cartee, R. E. & Bartels, J. E. (1995). Computed tomographic anatomy of the canine lumbosacral spine. *Veterinary radiology & ultrasound*, 36(2), 91–99.
- Junqueira, L. C. & Carneiro, J. (Eds.) (2005). Nerve tissue & the nervous system. In Junqueira, L. C & Carneiro, J. (Eds.), *Basic histology Text & Atlas* (11^a Edição, pp 167 - 169). USA: McGraw-Hill, Medical Publishing Division.
- Karcher, R. E. & Landers, J. P. (2001). Electrophoresis. In Burtis, C. A., Ashwood, E. R. & Bruns, D. E. (Eds.) *Tietz fundamentals of clinical chemistry* (6^a Edição, pp 102 - 111). Missouri, USA: Saunders Elsevier Inc.
- Keep, R. F. & Smith, D. E. (2011). Choroid plexus transport: gene deletion studies. *Fluids and barriers of the CNS*, 8(26), 1-9.
- Kidd, L., Maggi, R., Diniz, P. P. V. P., Hegarty, B., Tucker, M. & Breitschwerdt, E. (2008). Evaluation of conventional and real-time PCR assays for detection and differentiation of Spotted Fever Group Rickettsia in dog blood. *Veterinary microbiology*, 129(3–4), 294–303.
- Kim, D. Y., Royal, A. B. & Villamil, J. A. (2009). Disseminated melanoma in a dog with involvement of leptomeninges and bone marrow. *Veterinary pathology*, 46(1), 80–3.
- King, A. S. (Ed.) (2005). *Physiological and clinical anatomy of the domestic mammals. Volume 1 Central nervous system* (Reprinted 2011, pp 13 - 23, 266, 280, 291). Oxford, UK: Blackwell Publishing.
- Kiš, I., Foršek, J., Matijatko, V., Kučer, N. & Šimonji, K. (2008). Steroid-responsive meningitis-arteritis in a dog- a case report. *Veterinarski arhiv*, 78(6), 529–538.
- Kishimoto, M., Yamada, K., Ueno, H., Kobayashi, Y. & Wisner, E. R. (2004). Spinal cord effects from lumbar myelographic injection technique in the dog. *The journal of veterinary medical science / the Japanese society of veterinary science*, 66(1), 67-9.
- Kolmer, J. A., Spaulding, E. H. & Robinson, H. W. (Eds) (1952). Examination of cerebrospinal fluid. In Kolmer, J. A., Spaulding, E. H. & Robinson, H. W. (Eds). *Approved laboratory technic* (5^a Edição pp 289 - 314). USA: D. Appleton and Company Inc.
- Komp, D. M. (1972). Cyto centrifugation in the management of central nervous system leukemia. *The journal of pediatrics*, 81(5), 992–4.

- Kontopolous, E., Minns, R. A., O'Hare, A. E. & Eden, O. B. (1986). Sedimentation cytomorphology of the CSF in ventriculitis. *Developmental medicine & child neurology*, 28(2):213-9.
- Kricka, L. J. & Park, J. Y. (2001). Optical techniques. In Burtis, C. A., Ashwood, E. R. & Bruns, D. E. (Eds.) *Tietz fundamentals of clinical chemistry* (6ª Edição, pp 63 - 83). Missouri, USA: Saunders Elsevier Inc.
- Lamb, C. R., Croson, P. J., Cappello, R. & Cherubini, G. B. (2005). Magnetic resonance imaging findings in 25 dogs with inflammatory cerebrospinal fluid. *Veterinary radiology & ultrasound*, 46(1), 17-22.
- Lefbom, B. K. & Parker, G. A. (1995). Ataxia associated with lymphosarcoma in a dog. *Journal of the american veterinary medical association*, 207(7), 922 - 923.
- Lehmitz, R. (1988). Concentrating cerebrospinal fluid cells with the sedimentation chamber--comparative methodologic studies. *Psychiatrie, neurologie und medizinische psychologie*, 40(4): 228-31.
- Levine, J. M., Levine, G. J., Johnson, S. I., Kerwin, S. C., Hettlich, B. F. & Fosgate, G. T. (2007). Evaluation of the success of medical management for presumptive thoracolumbar intervertebral disk Herniation in dogs. *Veterinary surgery*, 36(5), 482–491.
- Lorenzs, M. D., Coates, J. R. & Kent, M. (Eds.) (2011a). Confirming a diagnosis. In Lorenzs, M. D., Coates, J. R. & Kent, M. (Eds.) *Handbook of veterinary neurology* (5ª Edição, pp 81 - 85). Missouri, USA: Saunders, an imprint of Elsevier Inc.
- Lorenzs, M. D., Coates, J. R. & Kent, M. (Eds.) (2011b). Pelvic Limb Paresis, Paralysis, or Ataxia. In Lorenzs, M. D., Coates, J. R. & Kent, M. (Eds.) *Handbook of veterinary neurology* (5ª Edição, pp 109 - 120). Missouri, USA: Saunders, an imprint of Elsevier Inc.
- Lowrie, M., Penderis, J., McLaughlin, M., Eckersall, P. D. & Anderson, T. J. (2009). Steroid Responsive Meningitis-Arteritis: a prospective study of potential disease markers, prednisolone treatment, and long-term outcome in 20 dogs (2006 –2008). *Journal of veterinary internal medicine*, 23, 862–870.
- Luján Feliu-Pascual, A., Garosi, L., Dennis, R. & Platt, S. (2008). Iatrogenic brainstem injury during cerebellomedullary cistern puncture. *Veterinary radiology & ultrasound*, 49(5), 467-471.
- Lyon, S. D., Sanderson, M. W., Vaden, S. L., Lappin, M. R., Jensen, W. A. & Grauer, G. F. (2010). Comparison of urine dipstick, sulfosalicylic acid, urine protein-to-creatinine ratio, and species-specific ELISA methods for detection of albumin in urine samples of cats and dogs. *Journal of the american veterinary medical association*, 236(8), 874–879.
- Maiolini, A., Carlson, R., Schwartz, M., Gandini, G. & Tipold, A. (2012). Determination of immunoglobulin A concentrations in the serum and cerebrospinal fluid of dogs: An estimation of its diagnostic value in canine steroid-responsive meningitis–arteritis. *The veterinary journal*, 191(2), 219–224.
- Marcos, R. & Santos, M. (Eds.) (2011). Líquido cefalorraquidiano. In Peleteiro, M. C., Marcos, R., Santos, M., Correia, J., Pissarra, H. & Carvalho, T. (Eds.) *Atlas de citologia veterinária* (pp 249 - 261). Portugal: Lidel - Edições Técnicas, Lda.

- Maretzki, C. H., Fisher, D. J. & Greene, C. E. (1994). Granulocytic ehrlichiosis and meningitis in a dog. *Journal of the american veterinary medical association*, 205 (11), 1554 - 1556.
- Masty, J. (2008). Overview of neuroanatomy. In Furr, M. & Reed, S. (Eds.), *Equine neurology*. (pp. 3 - 5). Ames, Iowa 50014, USA: Blackwell Publishing.
- Masuzawa, T., Ohta, T., Kawamura, M., Nakahara, N. & Sato, F. (1984). Immunohistochemical localization of Na⁺, K⁺-ATPase in the choroid plexus. *Brain research* 302: 357–362.
- Mathiisen, T. M., Lehre, K. P., Danbolt, N. C. & Ottersen, O. P. (2010). The perivascular astroglial sheath provides a complete covering of the brain microvessels: an electron microscopic 3D reconstruction. *Glia*, 58(9), 1094-103.
- Mayberg, T. S., Lam, A. M., Matta, B. F., Domino, K. B. & Winn H. R. (1995). Ketamine does not increase cerebral blood flow velocity or intracranial pressure during isoflurane/nitrous oxide anesthesia in patients undergoing craniotomy, *Anesthesia & analgesia*: July,81 (1): 84-89.
- McBride, J. W., Corstvet, R. E., Gaunt, S. D., Chinsangaram, J., Akita, G. Y. & Osburn, B. I. (1996). PCR detection of acute Ehrlichia canis infection in dogs. *Journal of veterinary diagnostic investigation*, 8(4), 441–447.
- McCormick, C. P., Shihabi, Z. K. & Konen, J. C. (1989). Microtransferrinuria and microalbuminuria: enhanced immunoassay, *Annals of clinical & laboratory science*, 19(6) 444-451.
- McGeady, T. A., Quinn, P. J., FitzPatrick, E. S. & Ryan, M. T. (2006). 13 - Nervous system. In McGeady, T. A., Quinn, P. J., FitzPatrick, E. S. & Ryan, M. T. (Eds.) *Veterinary embryology* (pp 153 - 175). Oxford, UK: Blackwell Publishing.
- Meadows, R. L., MacWilliams, P. S., Dzata, G. & Delauche, A. J. (1992). Diagnosis of histoplasmosis in a dog by cytologic examination of CSF. *Veterinary clinical pathology*, 21(4), 122–124.
- Meyer, D. J., Coles, E. H. & Rich, L. J. (Eds.) (1992). Evaluation of cerebrospinal fluid. In Meyer, D. J., Coles, E. H. & Rich, L. J. (Eds.) *Veterinary laboratory medicine: interpretation and diagnosis*. (pp 121 - 124).
- Mitchel, R. A., Loeschcke, H. H., Massion, W. H. & Severinghaus, J. W. (1963). Respiratory responses mediated through superficial chemosensitive areas on the medulla. *Journal of applied physiology*, 18(3), 523-533.
- Mohammedi, H., Mamouzi, S., Allal, C., Ghaffor, M., Rabhi, H. & Abbadi, M. C. (1989). Rapid and sensitive micromethod for protein determination by the Coomassie-blue technique. *Archives de l'institut pasteur d'algerie* 57:151-62.
- Moroff, G., Eich, J. & Dabay, M. (1994). Validation of use of the Nageotte hemocytometer to count low levels of white cells in white cell-reduced platelet components. *Transfusion*, 34(1):35-8.
- Muir III, W. W., Hubbel, J. A., Skarda, R. T. & Bednarski, R. M. (Eds.) (2000). Specific intravenous anesthetic drugs. In Muir III, W. W., Hubbel, J. A., Skarda, R. T. & Bednarski, R. M. (Eds.) *Handbook of veterinary anesthesia* (3^a Edição, pp 153). Ohio, USA: Mosby, Inc.

- Muñana, K. R. & Luttgen, P. J. (1998). Prognostic factors for dogs with granulomatous meningoencephalomyelitis: 42 cases (1982-1996). *Journal of the american veterinary medical association*, 212(12): 1902 - 1906.
- Nazifi, S., Karimi, I., Hosseini nezhad, M., Hosseini, F. & Esmailnezhad, Z. (2006). Evaluation of haematological, serum biochemical and cerebrospinal fluid parameters in experimental bacterial meningoencephalitis in the dog. *Comparative clinical pathology*, 15(1), 44–48.
- Negrin, A., Cherubini, G. B. & Steeves, E. (2008). *Angiostrongylus vasorum* causing meningitis and tectection of parasite larvae in the cerebrospinal fluid of a pug dog. *Journal of small animal practice*, 49 (9), 468 - 471.
- Německová, J. (1991). A sedimentation chamber for cytological examination of cerebrospinal fluid. *Sb Ved Pr Lek Fak Karlovy Univerzity Hradci Kralove Suppl.* 34(5): 587-92.
- Nghiem, P. P. & Schatzberg, S. J. (2010). Conventional and molecular diagnostic testing for the acute neurologic patient. *Journal of veterinary emergency and critical care*, 20(1), pp 46 - 61.
- Nicholls, J. G., Martin, A. R. & Wallace, B. G. (Eds.) (1992). Chapter 6 - Properties and functions of neuroglia cells. In Nicholls, J. G., Martin, A. R. & Wallace, B. G. (Eds.) *From neuron to brain*. (3ª Edição, pp 167 - 169) Massachusetts, USA: Sinauer Associates, Inc.
- Nilsson, K., Elfving, K. & Pahlson, C. (2010). *Rickettsia helvetica* in patient with meningitis, Sweden, 2006. *Emerging infectious diseases*, 16(3), 490-492.
- Olby, N. J. (2004). Tetraparesis. In Platt, R. S. & Olby, N. J. (Eds.) *BSAVA manual of canine and feline neurology* (3ª Edição, pp 229). Gloucester, UK: British Small Animal Veterinary Association.
- Olby, N. J., Müntana, K. R., Sharp, N. J. H. & Thrall, D. E. (2000). The computed tomographic appearance of acute thoracolumbar intervertebral disc herniation in dogs. *Veterinary radiology & ultrasound*, 41(5), 396–402.
- Oppelt, W. W., Patlak, C. S. & Rall, D. P. (1964). Effect of certain drugs on cerebrospinal fluid production in the dog. *Legacy content: american journal of physiology*, 206(2), 247-250.
- Ortiz, A. G. (Ed.) (2004). Tejido nervioso. In Ortiz, A. G. & Rodríguez, A. B. (Eds.) *Tratado de histología veterinaria* (pp 159 a 194). Barcelona, España: Masson, S.A.
- O'Toole, D., Sato, A. F. & Rozanski, E. A. (2003). Cryptococcosis of the central nervous system in a dog. *Journal of the american veterinary medical association*, 222(12), 1722–1725.
- Parent, J. (1999). Neurologic disorders. In Willard, M. D., Tvedten, H. & Turnwald, G. H. (Eds.) *Small animal clinical diagnosis by laboratory methods* (3ª Edição, pp 279 - 284). Pennsylvania, USA: W. B. Saunders Company.
- Peters, M., Pohlenz, J., Jatón, K., Ninet, B. & Bille, J. (1995). Studies of the detection of *Listeria monocytogenes* by culture and PCR in cerebrospinal fluid samples from ruminants with listeric encephalitis. *Journal of veterinary medicine, series B*, 42(1-10).

- Petersdorf, R. G., Garcia, M. & Swarner, D. R. (1959). Mechanism of hypoglycorrhachia in experimental pneumococcal meningitis. *Experimental biology and medicine*, 102(3), 669-672.
- Petersdorf, R. G. & Harter, D. H. (1961). The fall in cerebrospinal fluid sugar in meningitis: Some experimental observations. *Archives of neurology*, 4(1), 21–30.
- Pfaff, A. D., March, P. A. & Fishman, C. (2000). Acute bilateral trigeminal neuropathy associated With nervous system lymphosarcoma in a dog. *Journal of the american animal hospital association*, 36, 57–61.
- Platt, S. R. (2004). Neck and back pain. In Platt, R. S. & Olby, N. J. (Eds.) *BSAVA manual of canine and feline neurology* (3ª Edição, pp 208 - 210). Gloucester, UK: British Small Animal Veterinary Association.
- Platt, S. R., Dennis, R., Murphy, K. & Stefani, A. (2005). Hematomyelia secondary to Lumbar cerebrospinal fluid acquisition in a dog. *Veterinary radiology & ultrasound*, 46(6), 467-471.
- Pollay, M. & Welch, K. (1962). The function and structure of the canine arachnoid villi. *Journal of Surgical Residency* 2, 307. Citado por Hoerlein, B. F. (Ed.) & Gage, E. D. (1978) em *Canine neurology diagnosis and treatment* (3ª Edição, pp 733 - 736). Philadelphia, USA: W. B. Saunders Company.
- Praetorius, J. (2007). Water and solute secretion by the choroid plexus. *Pflügers archive: european journal of physiology*, 454(1), 1-18.
- Radaelli, S. T. & Platt, S. R. (2002). Bacterial Meningoencephalomyelitis in Dogs: A Retrospective Study of 23 Cases (1990-1999). *Journal of veterinary internal medicine*, (16), pp 159-163.
- Rakich, P. M. & Latimer, K. S. (Ed.) (2003). Cytology. In Latimer, K. S., Mahaffey, E. A. & J. R., Presse (Eds.), *Duncan & Prasse's Veterinary laboratory medicine: clinical pathology* (4ª Edição, pp 321 - 323). Iowa, USA: Iowa State University Press.
- Ramirez, O., & Thrall, D. E. (1998). A review of imaging techniques for canine cauda equina syndrome. *Veterinary radiology & ultrasound*, 39(4), 283-296.
- Rand, J. S., Parent, J., Percy, D. & Jacobs, R. (1994). Clinical, cerebrospinal fluid, and histological data from thirty-four cats with primary noninflammatory disease of the central nervous system. *The Canadian veterinary journal/ La revue vétérinaire canadienne*, 35(3), 174-81.
- Ravel, R. (Ed.) (1984). Exame do líquido cefalorraquiano. In Ravel, R. (Ed.) *Laboratório clínico - Aplicações clínicas dos achados laboratoriais* (4ª Edição, pp 165 - 170). Rio de Janeiro, Brasil: Editora Guanabara.
- Reiber, H. & Peter, J. B. (2001). Cerebrospinal fluid analysis: disease-related data patterns and evaluation programs. *Journal of the neurological sciences*, 184(2), 101–22.
- Reiber, H. (2003). Proteins in cerebrospinal fluid and blood: barriers, CSF flow rate and source-related dynamics. *Restorative neurology and neuroscience* 21, 79–96.
- Reichenbach, A. & Wolburg, H. (2004). Astrocytes and ependymal glia. In Ransom, B. R. & Kettenmann, H. (Eds.) *Neuroglial cells*. (2ª Edição, pp 19 – 35) Oxford, UK: Oxford University Press.

- Ressel, L. (Ed.) (2010). Citotipi: ependimocita. In Ressel, L. (Ed.) *Principi di identificazione morfologica in citologia nem cane e nel gatto*. (pp 54). Milano, Italia: Poletto Editore.
- Robertson, I. & Thrall, D. E. (2011). Imaging dogs with suspected disc herniation: pros and cons of myelography, computed tomography, and magnetic resonance. *Veterinary radiology & ultrasound*, 52, S81–S84.
- Rosato, P. N., Gama, F. G. V. & Santana, A. E. (2006). Physical-chemical analysis of the cerebrospinal fluid of healthy dogs submitted to different storage periods and temperatures. *Ciência rural, Santa Maria*, 36(6), 1806–1810.
- Rosenberg, G. A. (2004). Brain edema and disorders of cerebrospinal fluid circulation. In Bradley, W. G., Daroff, R. B., Fenichel, G. M. & Jankovic, J. (Eds.) *Neurology in clinical practice, the neurological disorders, volume II* (4ª Edição, pp 1745 - 1762). Philadelphia, USA: Butterworth Heinemann - Elsevier, Inc.
- Rosin, A. (1982). Neurologic disease associated with lymphosarcoma in ten dogs. *Journal of the american veterinary medical association*, 181(1), 50 - 53.
- Ross, M. H., Kaye, G. I. & Pawlina W. (Eds.) (2003a). Nerve tissue. In Ross, M. H., L., Kaye, G. I. & Pawlina, W. *Histology a text and atlas*. (4ª Edição, pp 297 - 324). Baltimore, USA: Williams & Wilkins.
- Ross, M. H., Kaye, G. I. & Pawlina W. (Eds.) (2003b). Cardiovascular system. In Ross, M. H., L., Kaye, G. I. & Pawlina, W. *Histology a text and atlas*. (4ª Edição, pp 338 - 340). Baltimore, USA: Williams & Wilkins.
- Ross, J. S., & Modic, M. T. (1992). Current assessment of spinal degenerative disease with magnetic resonance imaging. *Clinical orthopaedics and related research*, 279.
- Ruotsalo, K., Poma, R., da Costa, R. C. & Bienzle, D. (2008). Evaluation of the ADVIA 120 for analysis of canine cerebrospinal fluid. *Veterinary clinical pathology*, 37(2), 242-248.
- Saito, T. B., Alfieri, A. A., Wosiacki, S. R. & Negra, F. J. (2006). Detection of canine distemper virus by reverse transcriptase-polymerase chain reaction in the urine of dogs with clinical signs of distemper encephalitis. *Research in veterinary science*, 80, 116–119.
- Salvadori, C., Baroni, M., Arispici, M., & Cantile, C. (2007). Magnetic resonance imaging and pathological findings in a case of canine idiopathic eosinophilic meningoencephalitis. *Journal of small animal practice*, 48(8), 466–469.
- Santos, R. P., Figheral, R. A., Beckmann, D. V., Brum, J. S., Ripplinger, A., Neto, D. P., Baumhardt, R. & Mazzanti, A. (2012). Neoplasmas envolvendo o sistema nervoso central de cães: 26 casos (2003-2011). *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 32(2), 153-158 .
- Schadé, J. P. & Ford, D. H. (Eds.) (1971). Functional subdivision: cerebrospinal fluid. In Schadé, J. P. & Ford, D. H. (Eds.) *Basic neurology* (2ª Edição, pp 86 - 88). Amsterdam, Netherlands: Elsevier Inc.
- Schaller, O. (Ed.) (1999). Sistema nervoso. In Schaller, O. (Ed.) *Nomenclatura anatômica veterinária ilustrada* (pp 462 a 464). São Paulo, Brasil: Editora Manole, Ltda.

- Schatzberg, S. J., Haley, N. J., Barr, S. C., Olby, N., Munana, K. & Sharp, N. J. H. (2003). Use of a multiplex polymerase chain reaction assay in the antemortem diagnosis of toxoplasmosis and neosporosis in the central nervous system of cats and dogs. *American journal of veterinary research*, 64(12), 1507–1513.
- Schwartz, M., Moore, P. F. & Tipold, A. (2008). Disproportionally strong increase of B cells in inflammatory cerebrospinal fluid of dogs with Steroid-responsive Meningitis-Arteritis. *Veterinary immunology and immunopathology*, 125(3–4), 274–283.
- Schwedler, M., Miletich, D. J. & Albrecht, R. F. (1982). Cerebral blood flow and metabolism following ketamine administration, *Canadian journal of anaesthesia/ Journal canadien d'anesthésie*, 29 (3): 222-226.
- Scott, H. W. (1997). Hemilaminectomy for the treatment of thoracolumbar disc disease in the dog: a follow-up study of 40 cases. *The Journal of small animal practice*, 38 (11), 488–94.
- Scott, H. W. & McKee, W. M. (1999). Laminectomy for 34 dogs with thoracolumbar intervertebral disc disease and loss of deep pain perception. *The Journal of small animal practice*, 40(9), 417–22.
- Seehusen, D., Reeves, M. & Fomin, D. (2003). Cerebrospinal Fluid Analysis. *American family physician*, 68(6), 1103–1108.
- Shapiro, H. M., Wyte, S. R. & Harms, A. B. (1972). Ketamine anaesthesia in patients with intracranial pathology. *British journal of anaesthesia*, 44, 1200-1204.
- Sharp, N. J. H. & Wheeler, S. (Eds.) (2005). Patient examination. In Sharp, N. J. H. & Wheeler, S. (Eds.) *Small animal spinal disorders - disorders and surgery* (2ª Edição pp 32 - 33). London, UK: Elsevier Inc.
- Sharples, R. W. & van der Eijk, P. (Trs.) (2008) *Nemesius, on the nature of man. Tr. by P. van der Eijk & R.W. Sharples*. Liverpool, USA. Liverpool University Press - Translated Texts for Historians.
- Smith, J. J. & Kampine, J. P. (Eds.) (1990). Circulation to special regions. In Smith, J. J. & Kampine, J. P. (Eds.) *Circulatory physiology - the essentials*. (3ª Edição, pp 182 - 191). Baltimore, USA: Williams & Wilkins.
- Smith-Maxie, L. L., Parent, J. P., Rand, J., Wilcock, B. P. & Norris, Ai. M. (1989). Cerebrospinal fluid analysis and clinical outcome of eight dogs with eosinophilic meningoencephalomyelitis. *Journal of veterinary internal medicine*, 3(3), 167–174.
- Snyder, P. W., Kazacos, E. A., Scott-Moncrieff, J. C., HogenEsch, H., Carlton, W. W., Glickman, L. T. & Felsburg, P. J. (1995). Pathologic features of naturally occurring juvenile polyarteritis in beagle dogs. *Veterinary pathology*, 32 (4), 337–345.
- Snyder, L. A., Tarigo, J. L. & Neel, J. A. (2007). Cerebrospinal fluid from a dog with hind limb ataxia. *Veterinary clinical pathology*, 36(4), 379–381.
- Sorjonen, D. C. (1987). Total protein, albumin quota, and electrophoretic patterns in cerebrospinal fluid of dogs with central nervous system disorders. *American journal of veterinary research*, 48, 301–305.

- Sorjonen, D. C., Cox, N. R. & Swango, L. J. (1989). Electrophoretic determination of albumin and gamma globulin concentrations in the cerebrospinal fluid of dogs with encephalomyelitis attributable to canine distemper virus infection: 13 cases (1980-1987). *Journal of the american veterinary medical association*, 195 (7), 977 - 980.
- Spano, J. S. & Hoerlein, B. F. (Ed.) (1978). Laboratory examinations. In Hoerlein, B. F. (Ed.) *Canine neurology diagnosis and treatment* (3ª Edição, pp 136 - 149). Philadelphia, USA: Saunders Company.
- Srugo, I., Aroch, I., Christopher, M. M., Chai, O., Goralnik, L. & Shamir, M. H. (2011). Association of cerebrospinal fluid analysis findings with clinical signs and outcome in acute nonambulatory thoracolumbar disc disease in dogs. *Journal of veterinary internal medicine*, 25, 846–855.
- Steele, R. W., Marmer, D. J., O'Brien, M. D., Tyson, S. T. & Steele, C. R. (1986). Leukocyte survival in cerebrospinal fluid. *Journal of clinical microbiology*, 23(5), 965–966.
- Stiles, J., Prade, R. & Greene, C. (1996). Detection of *Toxoplasma gondii* in feline and canine biological samples by use of the polymerase chain reaction. *American journal of veterinary research*, 57(3), 264–267.
- Storts, R. W. & Montgomery, D. L. (2001). The nervous system. In McGavin, M. D., Carlton, W. W. & Zachary, J. F. (Eds.) *Thomson's special veterinary pathology* (3ª Edição, pp 386 - 388). Missouri, USA: Mosby, Inc.
- Strazielle, N. & Gherzi-Egea, J. F. (2000). Choroid plexus in the central nervous system: biology and physiopathology. *Journal of neuropathology and experimental neurology*, 59(7), 561-74.
- Suzuki, M., Uchida, K., Morozumi, M., Hasegawa, T., Yanai, T., Nakayama, H. & Tateyama, S. (2003). A comparative pathological study on canine necrotizing meningoencephalitis and granulomatous meningoencephalomyelitis. *The journal of veterinary medical science / The japanese society of veterinary science*, 65(11), 1233–1239.
- Symons, A. & Brown, M. H. (2000). Biochemical characterization of lymphocyte surface antigens. In Rowland-Jones, S. L. & McMichael, A. J. (Eds.) *Lymphocytes - a practical approach* (2ª Edição, pp 288 - 289). Oxford, UK: Oxford University Press.
- Tanaka, H., Nakayama, M. & Takase, K. (2004). Usefulness of myelography with multiple views in diagnosis of circumferential location of disc material in dogs with thoracolumbar intervertebral disc herniation. *The journal of veterinary medical science / the japanese society of veterinary science*, 66(7), 827–833.
- Taylor, S. M. (2009). Diagnostic tests for the neuromuscular system. In Nelson, R. W. & Couto, C. G. (Eds.), *Small animal internal medicine* (4ª Edição, pp 1008 - 1011). Missouri, USA: Elsevier Inc.
- Thomas, W. B. (1998). Inflammatory diseases of the central nervous system in dogs. *Clinical techniques in small animal practice*, 13(3), 167–178.
- Thomson, C. E., Kornegay, J. N. & Stevens, J. B. (1990). Analysis of cerebrospinal fluid from the cerebellomedullary and lumbar cisterns of dogs with focal neurologic disease: 145 cases (1985-1987). *Journal of the american veterinary medical association*, 196(11), 1841-1844.

- Thorpe, R. & Thorpe S. (2005). Immunochemical techniques: immunoassays. In Wilnson, K. & Walker, J. (Eds.), *Principles and techniques of biochemistry and molecular biology* (6ª Edição, pp 331 - 341). New York, USA: Cambridge University Press.
- Thrall, M. A. (2004). Laboratory detection of muscle injury. In Thrall, M. A. (Ed.) *Veterinary hematology and clinical chemistry* (pp 417 - 420). Philadelphia: Lippincot.
- Tipold, A., Pfister, H. & Vandeveld, M. (1993). Determination of the IgG index for the detection of intrathecal immunoglobulin synthesis in dogs using an elisa. *Research in veterinary science*, 54(1), 40–44.
- Tipold, A. & Jaggy, A. (1994). Steroid responsive meningitis-arteritis in dogs: Long-term study of 32 cases. *Journal of small animal practice*, 35: 311–316
- Tipold, A., Pfister, H., Zurbriggen, A. & Vandeveld, M. (1994). Intrathecal synthesis of major immunoglobulin classes in inflammatory diseases of the canine CNS. *Veterinary immunology and immunopathology*, 42(2), 149–159.
- Tipold, A. (1995). Diagnosis of inflammatory and infectious diseases of the central nervous system in dogs: a retrospective study. *Journal of veterinary internal medicine/American college of veterinary internal medicine*, 9(5), 304–14.
- Tipold, A., Vandeveld, M. & Zurbriggen, A. (1995). Neuroimmunological studies in steroid-responsive meningitis-arteritis in dogs. *Research in veterinary science*, 58(2), 103–108.
- Tipold, A. (2003). Cerebrospinal fluid. In Vite C. H. (Ed.), *Braund's clinical neurology in small animals: localization, diagnosis and treatment*, International Veterinary Information Service, Ithaca NY.
- Tipold, A. & Schatzberg, S. J. (2010). An update on steroid responsive meningitis-arteritis. *The journal of small animal practice*, 51(3), 150–4.
- Toto, R. D. (2004). Microalbuminuria: definition, detection, and clinical significance. *The journal of clinical hypertension*, 6(11), 2-7.
- Vandeveld, M. & Spano, J. S. (1977). Cerebrospinal fluid cytology in canine neurologic disease. *American journal of veterinary research*, 38(11), 1827 - 1832.
- Vandeveld, M., Jaggy, A. & Lang, J. (Eds.) (2003). Sezione I - Fondamenti della giagnostica neurologica: 5. Esami collaterali specialistici: Analisi del liquido cerebrospinale (LCS). In Vandeveld, M., Jaggy, A. & Lang, J. (Eds.). *Neurologia veterinaria dall'approccio al paziente alla terapia* (Baroni, M. & Mariscoli, M. - Edizione italiana, pp 49 - 55). Milano, Italia: Masson Edizioni Veterinarie.
- Vernau, W. (2000). Cerebrospinal Fluid Assessment in Dogs and Cats. In *Proceedings of the 50° Congresso nazionale multisala SCIVAC*, 2005 (pp. 1–3). Rimini, Italia.
- Walker, J. M. (Ed.) (2005). Electrophoretic techniques: electrophoresis of proteins. In Wilnson, K. & Walker, J. (Eds.), *Principles and techniques of biochemistry and molecular biology* (6ª Edição, pp 457 - 472). New York, USA: Cambridge University Press.
- Wamsley, H. & Alleman, A. R. (2004). Clinical pathology. In Platt, R. S. & Olby, N. J. (Eds.) *BSAVA manual of canine and feline neurology* (3ª Edição, pp 42 - 53). Gloucester, UK: British Small Animal Veterinary Association.

- Whitmore, E. L., Hochberg, F., Wolfson, L., Royalty, J. & Taft, P. D. (1982). Quantitative cytocentrifugation in the evaluation of cerebrospinal fluid. *Acta cytologica*, 26 (6), 847-850.
- Widmer, W. R., Blevins, W. E., Cantwell, H. D., Cook, J. R. & DeNicola, D. B. (1990). Cerebrospinal fluid response following metrizamide myelography in normal dogs: effects of routine myelography and postmyelographic removal of contrast medium. *Veterinary clinical pathology*, 19(3), 66–76.
- Willis Jr., W. D. (1993). The nervous system. In Berne, R. M. & Levy, M. N. (Eds.) *Physiology* (3ª Edição, pp 96 - 102). Missouri, USA: Mosby - Year Book, Inc.
- Wilson, E. & Oehninger, C. (2007). Antigüedad a nuestros días. *Archivos del instituto de neurología*, Janeiro (10), 1-14.
- Windsor, R. C., Vernau, K. M., Sturges, B. K., Kass, P. H. & Vernau, W. (2008). Lumbar cerebrospinal fluid in dogs with type I intervertebral disc herniation. *Journal of veterinary internal medicine*, 22 (4), 954 - 960.
- Windsor, R. C., Sturges, B. K., Vernau, K. M. & Vernau, W. (2009). Cerebrospinal fluid eosinophilia in dogs. *Journal of veterinary diagnostic investigation*, (23), 275–281.
- Wolburg, H. & Paulus, W. (2010). Choroid plexus: biology and pathology. *Acta neuropathologica*, 119 (1), 75-88.
- Wood, A., Garosi, L. & Platt, S. (2012). Part I - Admission and neurodiagnostics tests: Cerebrospinal fluid analysis. In Platt, S. R., & Garosi, L. S. (Eds.). *Small animal neurological emergencies* (pp 121 - 136). London, UK: Manson Publishing Ltd.
- Yamashita, J., Oda, Y., Takeuchi, J., Nakao, S., Iwaki, K. & Handa, H. (1979). Cerebrospinal fluid (CSF) cytology using "cytopsin" in patients with brain tumors (author's transl). *No shinkei geka*, 7 (8), 751-8.
- Zhang, E. T., Richards, H. K., Kida, S. & Weller, R. O. (1992). Directional and compartmentalised drainage of interstitial fluid and cerebrospinal fluid from the rat brain. *Acta cytologica*, (83), 233–239.

Lista de Anexos

Anexo 1 - Breve descrição das actividades realizadas durante o estágio curricular e casuística.

Anexo 2 - Breve descrição das actividades realizadas durante os estágios adicionais.

Anexo 3 - Tabela-resumo das características fisiológicas do LCR.

Anexo 4 - Gatos e os achados no LCR.

Anexo 5 - Testes de normalidade de distribuição de valores das variáveis NúmeroMCD e PesoMCD.

Anexo 6 - Teste de Mann-Whitney U para as variáveis NúmeroMCD-LCR e PesoMCD-LCR

Anexo 7 - Teste de Chi-quadrado entre as variáveis LCR e Dx.

Anexo 1 - Breve descrição das actividades realizadas durante o estágio curricular e casuística.

1 - Actividades desenvolvidas no estágio

Durante um período de seis meses decorreu o estágio pertencente ao plano curricular do Mestrado Integrado de Medicina Veterinária, da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Técnica de Lisboa. As funções por mim desempenhadas foram supervisionadas e orientadas pelo Dr. João Carlos Gil da Silva Ribeiro e correspondia às de auxiliar na realização das consultas, assistência ou realização dos exames necessários a cada paciente, participar em procedimentos cirúrgicos, assim como ajudar no que fosse necessário quer às enfermeiras quer a qualquer outro médico veterinário (MV) de serviço na clínica.

Visto sermos vários estagiários no serviço de neurologia, estabeleceu-se um sistema rotativo, de modo a que cada estagiário ficasse responsável pelo seu doente, acompanhando-o sempre, desde o momento da consulta inicial até à alta médica. Deste modo era da responsabilidade de cada um actualizar as fichas clínicas de cada animal, enviar e receber qualquer resultado de análises pertencentes ao caso, participar na realização dos relatórios clínicos para os colegas MV referentes, estar presente em todas as consultas de controlo/accompanhamento que fossem necessárias a cada caso em concreto e, partilharmos com os outros estagiários, todos os nossos casos, de modo a que todos tivéssemos o maior proveito da casuística existente na clínica.

Assim sendo, às dez horas da manhã iniciava as minhas funções na RRV, período em que fazíamos a repartição dos casos do dia isto é, logo no início da manhã. Quando oportuno, realizava o levantamento de todas as informações pertinentes aos casos que me foram atribuídos, inquirindo os proprietários e recolhendo dados da anamnese. Seguidamente, efectuava o exame neurológico preliminar, que voltaria a ser realizado pelo meu orientador. Após a discussão do exame neurológico, neurolocalização e apresentação de orçamentos (caso este fosse aceite pelo proprietário) realizava os exames radiográficos necessários, as colheitas de sangue para análises, internas ou externas e as sedações (sempre sob a supervisão do Dr. Pedro Bragança Parreira).

Muitos dos casos requiriam uma avaliação imagiológica mais precisa, sendo essencial recorrer ou à mielografia, ou à RM, ou a ambas. Em ambos os exames é imprescindível a anestesia geral dos pacientes, de modo que, após a avaliação cardiológica (feita pelo estagiário de cardiologia e supervisionada pelo Dr. Pedro Parreira), era da minha responsabilidade auxiliar todo o procedimento anestésico. No caso das mielografias, após a administração do contraste OMNIPAQUE 300TM (Iohexol 300 mgI/mL), feita pelo Dr. João Ribeiro, no espaço subaracnóide, efectuava as radiografias, com o auxílio de outro colega estagiário ou de uma das enfermeiras, em todas as incidências necessárias. Se para o

correcto diagnóstico fosse aconselhável RM, então, no mesmo tempo anestésico, este exame era realizado.

Não foi objectivo de estágio passar a conhecer o processo de obtenção de imagem por RM, nem a sua total interpretação, visto ser da opinião do meu orientador que seis meses não são suficientes para tal. Contudo, com a prática passei a conhecer quais as vantagens e desvantagens deste tipo de exame imagiológico, assim como quais as ponderações de imagens que me é possível adquirir e qual o significado de algumas alterações de sinal que se podem obter.

Visto ser importante em muitos dos casos realizar-se a colheita de LCR e a sua respectiva análise (quer na clínica, quer recorrendo ao serviço de laboratórios externos), também competia-me auxiliar nesses procedimentos. Todas as colheitas eram efectuadas pelo Dr. João Ribeiro, sendo que a preparação do paciente fazia parte das funções dos estagiários. Após a colheita de LCR, a contagem total de células, a contagem diferencial e o teste de Pandy eram realizados pelo estagiário responsável pelo caso, ou por mim se houvesse disponibilidade.

Muitas das vezes, as estratégias terapêuticas propostas incluíam procedimentos cirúrgicos. Nesses casos, era da responsabilidade dos estagiários preparar o animal para os procedimentos cirúrgicos e, caso fosse necessário, ser o ajudante de cirurgião e instrumentista. No final das cirurgias, as monitorizações e o recobro do paciente eram garantidas pelo estagiário responsável.

Em algumas situações pontuais, em que os proprietários não aceitavam a terapêutica proposta, ou em situações em que clinicamente os tratamentos propostos não melhoram os prognósticos significativamente, recorreu-se à eutanásia de alguns doentes. Quando oportuno e depois de se obter os devidos consentimentos, realizavam-se necrópsias, onde eram retirados, ou na totalidade ou por vezes só porções afectadas, os órgãos que constituem o SNC, a saber o cérebro, o cerebelo e a medula espinal. Algumas das necrópsias foram feitas sob a supervisão da Dra. Ana Cristina Ribeiro, sendo que outras foram feitas exclusivamente por mim.

De momento a RRV não garante o funcionamento de 24h, nem durante o fim-de-semana. No entanto, caso houvesse alguma urgência, era essencial que, pelo menos, dois estagiários estivessem disponíveis para prestar auxílio ao(s) MV(s) de serviço.

Para as actividades realizadas durante este estágio curricular foram gastas cerca de 1500 horas.

2 - Casuística

Apresenta-se seguidamente um breve resumo da casuística recolhida durante o estágio realizado na RRV.

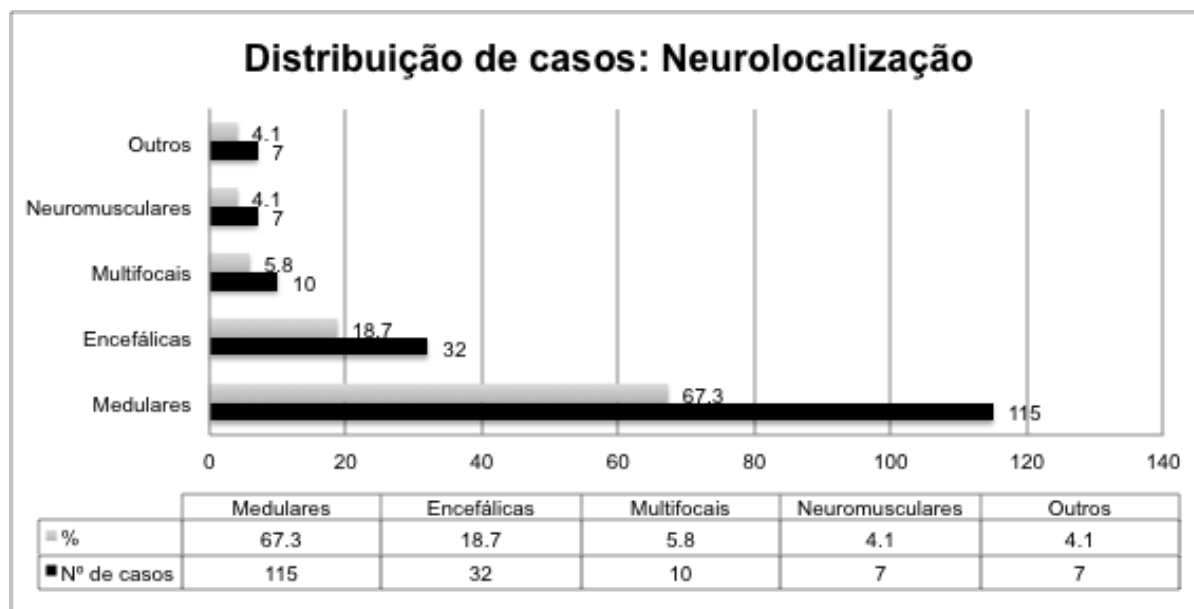
Ao longo dos seis meses de estágio, pude auxiliar e observar um total de 171 casos. Como referido inicialmente, todos os casos observados eram exclusivamente consultas de referência ou de segunda opinião, da especialidade de neurologia. A distribuição por espécie é de, aproximadamente, 91% de cães (156 em 171), 8% de gatos (14 em 171) e 1 furão (aproximadamente 1%).

De acordo com o procedimento médico explicado no número 1 deste anexo, durante a avaliação de cada doente surge a necessidade de localizar e classificar o tipo de lesão presente antes da realização de qualquer tipo de ECD. O raciocínio clínico pode ser organizado de acordo com 3 aspectos: 1) neurolocalização, 2) VITAMIN D e 3) grau de gravidade das lesões espinhais.

2.1 - Neurolocalização

Com a realização de um exame neurológico completo e sistemático é possível determinar a correcta localização da(s) lesão(ões). Tendo como base a distribuição anatómica das lesões podemos separar-las em 5 tipos de lesões: 1) lesões encefálicas, 2) lesões medulares 3), lesões neuromusculares, 4) lesões multifocais e 5) outros¹⁹ (Gráfico 8).

Gráfico 8 - Distribuição dos casos tendo em conta a sua localização neurológica.



¹⁹ Na categoria outros incluem-se os casos em que os sinais neurológicos dos pacientes eram devido a alterações sistémicas e não primariamente neurológicas ou casos em que com o exame neurológico determinou-se tratar de alterações ortopédicas ou de outros sistemas orgânicos.

2.2 - VITAMIN D

Com esta avaliação cada caso é classificado de acordo com a etiologia através da mnemónica *VITAMIN D*: V (vascular), I (idiopático, imune e inflamatório/infeccioso), T (trauma e tóxico), A (anomalias congénitas), M (metabólico), N (neoplasias e nutricional) e D (degenerativo). Com esta classificação a construção de uma lista de diagnósticos diferenciais é facilitada (Garosi, 2004). A tabela 23 mostra a frequência absoluta de casos e as respectivas afecções separadas por espécie.

Tabela 23 - Distribuição de afecções neurológicas observadas e a sua respectiva frequência absoluta.

		Número de casos por espécie		
		Cão	Gato	Furão
Etiologia	Vascular	1	-	-
	Idiopático	6	4	-
	Inflamatório	11	-	-
	Infeccioso	7	2	-
	Imune	2	-	-
	Traumatismo	8	1	-
	Tóxico	1	-	-
	Anomalias	8	-	-
	Metabólico	2	1	-
	Neoplasia	3	1	-
	Nutricional	-	-	-
	Degenerativo	36	1	1
	Sem diagnóstico	71	4	-

2.3 - Grau de Lesão

Conhecer o grau de lesão após trauma medular é imprescindível no procedimento diagnóstico para determinação do prognóstico e para a decisão médico-terapêutica. Principalmente para lesões medulares toraco-lombares, o nível de disfunção pode ser classificado nos seguintes 5 graus²⁰:

1. Apenas dor
2. Paraparésia ambulatória
3. Paraparésia não ambulatória
4. Paraplégia
5. Paraplégia com perda da sensibilidade à dor profunda

O prognóstico é mais reservado à medida que o grau de lesão aumenta (Scott, 1997; Scott & Mckee, 1999; Sharp & Wheeler, 2005).

²⁰ Estes graus de lesão são aplicáveis em lesões T3-L3 do motoneurónio superior. Associado a presença ou ausência de dor e capacidade motora também se observa o controlo da micção e da defecação.

- Garosi, L. (2004). Lesion localization and differential diagnosis. In Platt, R. S. & Olby, N. J. (Eds.) *BSAVA manual of canine and feline neurology* (3ª Edição, pp 32 - 34). Gloucester, UK: British Small Animal Veterinary Association.
- Scott, H. W. (1997). Hemilaminectomy for the treatment of thoracolumbar disc disease in the dog: a follow-up study of 40 cases. *The Journal of small animal practice*, 38 (11), 488–94.
- Scott, H. W. & McKee, W. M. (1999). Laminectomy for 34 dogs with thoracolumbar intervertebral disc disease and loss of deep pain perception. *The Journal of small animal practice*, 40(9), 417–22.
- Sharp, N. J. H. & Wheeler, S. (Eds.) (2005). Patient examination. In Sharp, N. J. H. & Wheeler, S. (Eds.) *Small animal spinal disorders - disorders and surgery* (2ª Edição pp 33 - 32). London, UK: Elsevier Inc.

Anexo 2 - Breve descrição das actividades realizadas durante os estágios adicionais e outras actividades.

1 - Tierspital da Vetsuisse-Fakultät, Universität Bern, Schweiz

Este estágio teve como principal objectivo complementar o estágio curricular, comparando protocolos médicos e tratamentos, epidemiologias e realidades económicas diferentes.

As semanas de 4 a 11 de Dezembro de 2011 e de 9 a 17 de Junho de 2012 foram passadas no Tierspital Bern - Vetsuisse-Fakultät, Universität Bern²¹, juntamente com os residentes de Neurologia, onde pude observar todo o seu trabalho, assim como auxiliar no que fosse necessário.

Diariamente, às oito da manhã, os residentes (Dr. Philemon Karli e Dr. Angela Fadda), juntamente com os assistentes (Dr. Lisa Alves e Professor Doutor Marc Vandeveld, o chefe de departamento) realizavam as rondas de neurologia. A segunda-feira consistia numa excepção já que nesse dia realizavam-se as rondas de todos os casos recebidos durante o fim-de-semana pelos internos de Medicina Interna, sendo então direccionados os pacientes para as respectivas especialidades. Durante o período da manhã eram realizados todos os meios complementares de diagnóstico (MCD) necessários aos doentes internados e actualizavam-se os relatórios clínicos dos mesmos. No período da tarde realizavam-se consultas (em francês ou alemão) onde eu fazia o exame neurológico aos pacientes. Todos os casos em que fosse necessário recorrer-se a técnicas imagiológicas passariam a estar sob a responsabilidade do departamento de imagem. Com isto tive a oportunidade de observar a realização de diversos MCD, a saber RM, TC, fluoroscopia, eco(cardio)grafia, electrofisiologia e tratamentos de fisioterapia, como o uso da passadeira subaquática.

Todas a quintas-feiras, às sete da manhã, é realizado o *journal club* de neurologia, onde são discutidos alguns artigos científicos escolhidos pelos residentes. Na semana de 9 a 17 de Junho de 2012 foi-me atribuído para discussão o artigo "*Imaging diagnosis - lack of contrast enhancement in metastatic cerebral adenocarcinoma*"²².

Adicionalmente, participei nas sessões neuroanatomopatologia, sob a supervisão do Prof. Dr. Marc Vandeveld, onde foram analisadas e descritas várias fotografias de alterações macroscópicas do SNC, procedendo-se à lista de diagnósticos diferenciais e a determinação da(s) causa(s) mais provável(is). Também pude assistir às rondas de RM juntamente com os residentes e assistentes de imagiologia.

Ao todo este pequeno estágio teve a duração de cerca de 100 horas.

²¹ Hospital Veterinário da Faculdade de Medicina Veterinária - Universidade de Berna, Suíça - Länggassstrasse 128 Postfach 8466, CH-3001 Bern, Switzerland.

²² Singh, J. B., Oevermann, A., Henke, D., Segard, E. & Gorgas, D. (2012). Imaging diagnosis - lack of contrast enhancement in metastatic cerebral adenocarcinoma. *Veterinary radiology & ultrasound*, 53(2), 193-196.

2 - Pathology Department - University of Liverpool, UK

Durante os meses de Agosto, Setembro e Outubro de 2012, realizei um estágio adicional, sob o programa ERASMUS, no Departamento de Patologia da Universidade de Liverpool²³. Após o início da realização desta dissertação surgiu a necessidade de complementar as bases que tinha em citologia. Deste modo, neste departamento, pude incrementar os meus conhecimentos nessa área, assim como em imunocitologia, histologia, imunohistologia e exame *post-mortem*.

Após dois dias de treinos e introdução às técnicas de segurança, passei a poder auxiliar os residentes e patologistas sêniores na realização de todas as necrópsias e exames *post-mortem*. Para além da necrópsia *per se*, com a descrição macroscópica dos órgãos, eram colhidas amostras para histologia, sendo fixadas em formalina a 10%, para posterior incorporação em parafina e corte histológico. Em todos os casos, primeiro é enviado um relatório preliminar, contendo os achados macroscópicos, sendo posteriormente completado com a descrição histológica e causa de morte mais provável.

O mesmo procedimento é realizado para citologias ou biópsias enviadas por diversos MV do país, sendo que por vezes também é necessário recorrer-se a colorações especiais ou a imunocitologia/imunohistologia.

Muitos dos casos recebidos são enviados pela *The Royal Society for the Prevention of Cruelty to Animals* (RSPCA). Todos os animais "RSCPA" são analisados segundo um protocolo diferente visto que, dependendo dos achados patológicos e das conclusões que deles advêm, estes casos podem vir a ser levadas a tribunal iniciando-se um processo judicial, que visa a acusação dos réus por crueldade animal.

Pude estar presente nas rondas de patologia equina, realizadas com os residentes do Hospital de equinos (*Equine Hospital*), onde casos clínicos seleccionados são apresentados e discutidos desde a abordagem clínica inicial até ao diagnóstico *post-mortem*.

Também fui convidado a leccionar uma aula prática de exame *post-mortem*, com duração de duas horas, a um grupo de 10 alunos portugueses de Medicina Veterinária do Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar, de visita pelo departamento, e a apresentar um caso nas rondas de neuropatologia, juntamente com o departamento de neurologia clínica do Hospital de pequenos animais (*Small Animal Hospital Teaching Hospital*).

Ao todo este estágio teve a duração de cerca de 700 horas.

²³ Veterinary Pathology, Jordan Building, Leahurst, University of Liverpool, Chester High Road, CH64 7TE, United Kingdom.

3 - Outras actividades

Durante o tempo de realização desta dissertação também foram realizadas outras actividades não relacionadas com o estágio curricular.

Tive a oportunidade de trabalhar para a Revista Ruminantes, onde vi publicados dois artigos da minha autoria, a saber: "*O mercado da carne bovina*" e "*Observatório - Perspectivas do mercado leiteiro*". Adicionalmente, fui convidado para fazer a revisão de conteúdos de um terço desse mesmo número da revista.

Tenho ainda participado em actividades relacionadas com o projecto europeu "*Animal Welfare Indicators*" (AWIN). De forma mais concreta, tenho estado a trabalhar com os grupos de trabalho 1 e 2, referentes ao bem-estar animal de cabras de leite auxiliando na recolha de dados, recolha e processamento de amostras biológicas e pesquisas adicionais. Pela minha participação pude ser incluído como autor do abstract com o título "*Conformation of the udder, is that a problem in our dairy farms? Preliminary results*" que foi aceite para apresentação oral no congresso "*Goat Milk Quality*" em Tromsø, Noruega, de 4 a 6 de Junho de 2013.

Anexo 3 - Tabela-resumo das características fisiológicas do LCR

Tabela 24 - Tabela-resumo das características fisiológicas do LCR. Adaptada de Lorenzs, Coates & Kent, 2011.

Afecção	Aparência	CTC (cél/mm ³)	CDx	Proteína (mg/dL)	Outros
Normal	Límpida	< 5	Mononuclear	< 25 (< 45 em punções lombares)	
Inflamatório - não infeccioso					
MARC	Límpido a turva	Aumentada (geralmente > 100)	Neutrófilos (não degenerados)	Aumentada	Medir IgA e α2-macroglobulina
MEG	Límpido a turva	Aumentada	Mononuclear (por vezes neutrófilos)	Aumentada	PCR e serologia para agentes infecciosos
Inflamatório infeccioso					
Bacteriano	Límpido a turva	Aumentada (geralmente > 100)	Maioritariamente neutrófilos (± degenerados)	Aumentada (geralmente > 100)	PCR e culturas (por vezes os agentes são visíveis)
Viral	Límpida	Aumentada (normalmente)	Predominantemente mononuclear	Aumentada (geralmente < 100)	PCR, títulos de Ac e microscopia electrónica
Fúngico	Límpido a turva	Aumentada (variável)	Pleocitose mista, por vezes eosinófilos	Aumentada (geralmente < 100)	PCR, títulos de Ac e culturas
Protozoário	Límpida	Aumentada	Mononuclear, por vezes neutrófilos	Aumentada (geralmente > 100)	Títulos de Ac e PCR
Parasitário	Límpido a xantocrómica	Aumentada (variável)	Pleocitose mista, por vezes eosinófilos	Aumentada (geralmente > 100)	
Outros					
Degenerativo, incluindo compressões	Límpida	Normal a ligeiramente aumentada	Mononuclear ou neutrófilos (por vezes misto)	Aumentada (geralmente < 100)	
Neoplásico	Límpida	Normal a aumentada	Mononuclear, por vezes neutrófilos	Aumentada (geralmente < 100)	
Traumático	Xantocrómica	Normal a aumentada	Eritrócitos e leucócitos	Aumentada (variável)	Contraindicado
Vascular	Xantocrómica	Normal a aumentada	Eritrócitos e leucócitos	Aumentada (variável)	Vascular

Anexo 4 - Gatos e os achados no LCR

Dos 14 gatos examinados na RRV durante os 6 meses de estágio realizou-se a colheita e análise do LCR em apenas 4 animais. A tabela 25 apresenta os resultados obtidos nas análises do LCR desses 4 gatos.

Tabela 25 - Resultados obtidos da análise dos LCR obtidos de 4 dos 16 gatos examinados durante o estágio curricular.

	Aparência	CTC	CDx	Pandy
1	Transparente e xantocrômico	> 500	População mista (mononucleares e neutrófilos)	(++++)
2	Límpido e translúcido	10	Pleocitose mononuclear	(-)
3	Límpido e translúcido	106	Pleocitose neutrofílica	(++++)
4	Transparente e xantocrômico	> 800	-	Sem informação

CTC - Contagem total de células; CDx - Citodiagnóstico; Pandy - teste de Pandy

Anexo 5 - Testes de normalidade de distribuição de valores das variáveis NúmeroMCD e PesoMCD. Tabelas originais obtidas pelo IBM®SPSS® Statistics version 20.

a) NúmeroMCD

Tabela 26 - Resumo do processamento da análise estatística da variável "NúmeroMCD".

	LCR	Cases					
		Valid		Missing		Total	
		N	Percent	N	Percent	N	Percent
NúmeroMCD	0	106	100.0%	0	0.0%	106	100.0%
	1	37	100.0%	0	0.0%	37	100.0%

Tabela 27 - Estatística descritiva da variável "NúmeroMCD".

LCR		Statistic	Std. Error		
NúmeroMCD	0	Mean	1.02	.119	
		95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	.78	
			Upper Bound	1.26	
		5% Trimmed Mean		.97	
		Median		.00	
		Variance		1.504	
		Std. Deviation		1.227	
		Minimum		0	
		Maximum		3	
		Range		3	
		Interquartile Range		2	
		Skewness	.689	.235	
		Kurtosis	-1.200	.465	
		1	Mean	2.84	.167
			95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	2.50
				Upper Bound	3.18
			5% Trimmed Mean		2.85
			Median		2.00
			Variance		1.029
			Std. Deviation		1.014
		Minimum		1	
		Maximum		4	
		Range		3	
		Interquartile Range		2	
		Skewness	.174	.388	
		Kurtosis	-1.774	.759	

Tabela 28 - Testes de normalidade para a variável "NúmeroMCD".

LCR		Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
		Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
NúmeroMCD	0	.316	106	.000	.740	106	.000
	1	.336	37	.000	.720	37	.000

a. Lilliefors Significance Correction

b) PesoMCD

Tabela 29 - Resumo do processamento da análise estatística da variável "PesoMCD".

	LCR	Cases					
		Valid		Missing		Total	
		N	Percent	N	Percent	N	Percent
PesoMCD	0	106	100.0%	0	0.0%	106	100.0%
	1	37	100.0%	0	0.0%	37	100.0%

Tabela 30 - Estatística descritiva da variável "PesoMCD".

LCR		Statistic	Std. Error		
PesoMCD	0	Mean	2.55	.311	
		95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	1.93	
			Upper Bound	3.16	
		5% Trimmed Mean		2.39	
		Median		.00	
		Variance		10.250	
		Std. Deviation		3.202	
		Minimum		0	
		Maximum		8	
		Range		8	
		Interquartile Range		5	
		Skewness	.758	.235	
		Kurtosis	-1.093	.465	
		1	Mean	7.54	.356
			95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	6.82
				Upper Bound	8.26
			5% Trimmed Mean		7.61
		Median		6.00	
		Variance		4.700	
		Std. Deviation		2.168	
		Minimum		2	
		Maximum		10	
		Range		8	
		Interquartile Range		4	
		Skewness	-.058	.388	
		Kurtosis	-.884	.759	

Tabela 31 - Testes de normalidade para a variável "PesoMCD".

LCR		Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
		Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
PesoMCD	0	.306	106	.000	.732	106	.000
	1	.329	37	.000	.719	37	.000

a. Lilliefors Significance Correction

Anexo 6 - Teste de Mann-Whitney U para as variáveis NúmeroMCD-LCR e PesoMCD-LCR. Tabelas originais obtidas pelo IBM®SPSS®Statistics version 20.

a) NúmeroMCD e LCR

Tabela 32 - Estatística descritiva para as variáveis "NúmeroMCD" e "LCR".

	N	Mean	Std. Deviation	Minimum	Maximum
NúmeroMCD	143	1.49	1.419	0	4
LCR	143	.26	.439	0	1

Tabela 33 - Ranks do teste de Mann-Whitney U para a variável "NúmeroMCD".

	LCR	N	Mean Rank	Sum of Ranks
NúmeroMCD	0	106	59.23	6278.00
	1	37	108.59	4018.00
	Total	143		

Tabela 34 - Testes não-paramétricos para duas variáveis independentes, a saber "NúmeroMCD" e "LCR" ^a.

	NúmeroMCD
Mann-Whitney U	607.000
Z	-6.488
Asymp. Sig. (2-tailed)	.000

a. Grouping Variable: LCR

b) PesoMCD e LCR

Tabela 35 - Estatística descritiva para as variáveis "PesoMCD" e "LCR".

	N	Mean	Std. Deviation	Minimum	Maximum
PesoMCD	143	3.84	3.686	0	10
LCR	143	.26	.439	0	1

Tabela 36 - Ranks do teste de Mann-Whitney U para a variável "PesoMCD".

	LCR	N	Mean Rank	Sum of Ranks
PesoMCD	0	106	58.14	6163.00
	1	37	111.70	4133.00
	Total	143		

Tabela 37 - Testes não-paramétricos para duas variáveis independentes, a saber "PesoMCD" e "LCR" ^a.

	PesoMCD
Mann-Whitney U	492.000
Z	-7.006
Asymp. Sig. (2-tailed)	.000

a. Grouping Variable: LCR.

Anexo 7 - Teste de Chi-quadrado entre as variáveis LCR e DX. Tabelas originais obtidas pelo IBM®SPSS®Statistics version 20.

Tabela 38 - Resumo do processamento da análise estatística das variáveis "Diagnóstico" e "LCR".

	Cases					
	Valid		Missing		Total	
	N	Percent	N	Percent	N	Percent
Diagnóstico * LCR	143	100.0%	0	0.0%	143	100.0%

Tabela 39 - Tabulação cruzada das variáveis "Diagnóstico" e "LCR".

		LCR		Total	
		0	1		
Diagnóstico	0	Count	55	11	66
		% within Diagnóstico	83.3%	16.7%	100.0%
		% within LCR	51.9%	29.7%	46.2%
		% of Total	38.5%	7.7%	46.2%
	1	Count	51	26	77
		% within Diagnóstico	66.2%	33.8%	100.0%
		% within LCR	48.1%	70.3%	53.8%
Total	% of Total	35.7%	18.2%	53.8%	
	Count	106	37	143	
	% within Diagnóstico	74.1%	25.9%	100.0%	
	% within LCR	100.0%	100.0%	100.0%	
	% of Total	74.1%	25.9%	100.0%	

Tabela 40 - Teste de Chi-quadrado entre as variáveis "Diagnóstico" e "LCR".

	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)	Exact Sig. (2-sided)	Exact Sig. (1-sided)
Pearson Chi-Square	5.418 ^a	1	.020	.022	.016
Continuity Correction ^b	4.563	1	.033		
Likelihood Ratio	5.564	1	.018		
Fisher's Exact Test					
Linear-by-Linear Association	5.380	1	.020		
N of Valid Cases	143				

a. 0 cells (.0%) have expected count less than 5. The minimum expected count is 17.08.

b. Computed only for a 2x2 table

		Value	Approx. Sig.
Nominal by Nominal	Phi	.195	.020
	Cramer's V	.195	.020
N of Valid Cases		143	