Luiz Fernando Nascimento Panigassi

Encefalopatias não infecciosas em cães:
avaliação anatomopatológica e imunohistoquímica

São Paulo

2011

Luiz Fernando Nascimento Panigassi

Encefalopatias não Infecciosas em cães:
avaliação anatomopatológica e imunohistoquímica

Dissertação apresentada ao Programa
de Pós-Graduação em Patologia
Experimental e Comparada da
Faculdade de Medicina Veterinária e
Zootecnia da Universidade de São
Paulo para obtenção do título de Mestre
em Ciências

Departamento:

Patologia

Área de Concentração:

Patologia Experimental e Comparada

Orientador:

Prof. Dr. Paulo César Maiorka

São Paulo

2011

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da
Universidade de São Paulo)

T.2535
FMVZ

Panigassi, Luiz Fernando Nascimento

Encefalopatias não infecciosas em cães: avaliação anatomopatológica e imunohistoquímica / Luiz Fernando Nascimento Panigassi. -- 2012.
80 f.

Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Patologia, São Paulo, 2012.

Programa de Pós-Graduação: Patologia Experimental e Comparada.

Área de concentração: Patologia Experimental e Comparada.

Orientador: Profa. Dra. Paulo César Maiorka.

1. Meningoencefalite granulomatosa. 2. Meningoencefalite necrosante.
3. Angiopatia amilóide. 4. Neuropatologia. 5. Cães. I. Título.

ERRATA

PANIGASSI, L. F. N. Encefalopatias não-infecciosas em cães: análise anatomopatológica e imunohistoquímica. 2012. 80 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

Página	Parágrafo	Onde se lê	Leia-se
Resumo	1º	cães: análise	cães: avaliação
Abstract	1º	cães: análise	cães: avaliação

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

Comissão de Ética no uso de animais

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Encefalopatias não-infecciosas em cães: análise anatomopatológica e imunohistoquímica", protocolado sob o nº 2489/2011, utilizando blocos de parafina contendo tecido animal, sob a responsabilidade do(a) Prof. Dr. Paulo Cesar Maiorka, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da "Comissão de Ética no uso de animais" da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado em reunião de 7/12/2011.

We certify that the Research "Non-infectious encephalopathies in dogs: anatomopathological and immunohistochemical analysis", protocol number 2489/2011, utilizing paraffin blocks containing animal tissue, under the responsibility Prof. Dr. Paulo Cesar Maiorka, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by "Ethic Committee in the use of animals" of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of University of São Paulo and was approved in the meeting of day 12/7/2011.

São Paulo, 8 de dezembro de 2011.

Denise Tabacchi Fantoni
Presidente

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: PANIGASSI, Luiz Fernando Nascimento

Título: Encefalopatias não-infecciosas em cães: avaliação anatomopatológica e imunohistoquímica

Dissertação apresentada ao Programa
de Pós-Graduação em Patologia
Experimental e Comparada da
Faculdade de Medicina Veterinária e
Zootecnia da Universidade de São
Paulo para obtenção do título de Mestre
em Ciências

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____
Instituição: _____

Prof. Dr. _____
Instituição: _____

Prof. Dr. _____
Instituição: _____

DEDICATÓRIA

À minha família, ao meu amor, aos
meus amigos. Obrigado por tudo.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Professor Paulo César Maiorka, pela amizade, por me aceitar como seu aluno, acreditando no projeto, por me auxiliar a realizar esta dissertação e cumprir mais uma etapa de minha vida.

Aos colegas de laboratório, pelas conversas, pela ajuda quando necessário, apoio e incentivo durante todo esse processo.

Aos meus pais, Carlos e Madalena, pela paciência, pelo carinho, pelo apoio e por terem ajudado este filho maluco a passar por essa etapa sem morrer de fome.

À minha mãe, Ana Maria Panigassi (*in memoriam*), porque seja lá onde seu espírito estiver, ela ainda continua a me incentivar e me ajudar. Sei que ela teria orgulho de ver onde todos nós chegamos.

À minha amada noiva, Danyela Aguiar, por todo seu amor, carinho, paciência, por nunca me deixar desistir e, durante os mais de 7 anos que estamos juntos (até o presente momento), não me deixar ficar maluco.

À toda minha família, tios, tias, avós, primos, porque, sem eles, eu não teria chegado tão longe. Sem o incentivo, sem o carinho, sem o amor. Todos são parte disso.

À todos os professores da FMVZ-USP, que me guiaram por todo esse processo, desde a graduação, provas, trabalhos, assim como o fazem, fizeram e ainda farão com muitos outros alunos.

À professora Lilian Rose Marques de Sá e seu grupo de pesquisa, pelos conselhos, pela ajuda na reta final, pelas conversas, risadas e companhia em nosso cantinho.

Aos grandes e ilustríssimos amigos do Grupo E, grandes amigos, sempre presentes, dispostos a irem aonde for por boa comida e piadas.

Aos animais, em especial à minha tropa de felinos Aliche (*in memorian*), Anchova, Temaki e Teppan, porque sem eles com certeza teríamos uma vida muito tediosa.

Aos funcionários Claudio Arroio e Luciano Bugalho, do departamento de Patologia Experimental e Comparada da FMVZ-USP, pela ajuda na confecção das lâminas, ensinamentos, piadas, conversas e amizade.

À toda equipe de biblioteca, em especial à Elza Faquim, pelo auxílio na normatização deste trabalho.

Ao CNPq, pelo auxílio financeiro.

“Donna ni mune ga itakutemo

Soba ni iru no

Zutto”

Tanaka Rie

“I’ll face it with a grin

I’m never giving in

On with the show”

Freddie Mercury

RESUMO

PANIGASSI, L. F. N. **Encefalopatias não-infecciosas em cães:** análise anatomopatológica e imunohistoquímica. [Noninfectious encephalopathies in dogs: anatomopathological and immunohistochemical analysis]. 2012. 80 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

O objetivo deste estudo foi verificar o comportamento anatomopatológico e expressão imunohistoquímica das proteínas GFAP, Vimentina, COX-2 e Amilóide β em 14 casos de encefalopatias não infecciosas em cães, mais especificamente Meningoencefalite Granulomatosa (MEG), Meningoencefalite Necrotizante (MEN) e Angiopatia Amilóide Cerebral (CAA). Foram coletadas informações clínicas (gênero, raça, idade) e morfológicas (necrose, presença de proteína amilóide, infiltrado inflamatório) dos animais. Para a expressão das proteínas por imunohistoquímica foram confeccionadas lâminas próprias para tal com amostras dos tecidos, juntamente com controles positivos das reações. A avaliação da expressão das proteínas foi de como positivo ou negativo para a marcação para GFAP, Vimentina e COX-2, e para o A β seguiu-se a classificação proposta por Olichney (1995), com quatro graduações. Animais SRD (4/14, 28%), de raça Maltês (2/14, 14%), Labrador (2/14, 14%), Poodle (3/14, 21%), Fox Terrier (1/14, 7%), Pug (1/14, 7%) e Bichon Frisé (1/14, 7%) fizeram parte deste estudo, na maioria machos (9/14, 63%). As lesões em todos os casos foram características, sendo que em MEG foi observado manguitos perivasculares abundantes com infiltrado inflamatório disperso pelo parênquima encefálico, caracterizando os quatro casos como de MEG disseminada. Em MEN foi observado o infiltrado inflamatório acompanhado de áreas de necrose, sinais característicos da doença. Nos casos de CAA foi observado agregados proteicos junto aos vasos sanguíneos do encéfalo, confirmados como sendo material amilóide por meio da coloração Vermelho Congo. Quanto a expressão dos antígenos por imunohistoquímica, houve a marcação de todos anticorpos em todos os casos, e, para os casos de CAA, houve uma maioria de casos com classificação 1 (5/6, 83%). Em conclusão: 1. os dados clínicos obtidos reproduzem o

comportamento biológico destas doenças em cães; 2. a análise imunohistoquímica das lesões de MEG, MEN e CAA apresentou resultados dentro dos quadros descritos na literatura; 3. a marcação positiva para COX-2 indica um aumento na atividade macrofágica no encéfalo; 4. as marcações de GFAP e Vimentina indicam uma reação das células da glia frente a lesão apresentada; 5. a utilização da imunohistoquímica como ferramenta de diagnóstico para estas doenças é válida.

Palavras-chave: Meningoencefalite Granulomatosa. Meningoencefalite Necrotizante. Angiopatia Amilóide. Cães. Imunohistoquímica. Neuropatologia.

ABSTRACT

PANIGASSI, L. F. N. **Noninfectious encephalopathies in dogs: anatomopathological and immunohistochemical analysis. [Encefalopatias Não-infecciosas em Cães: análise anatomopatológica e imunohistoquímica]**. 2012. 80 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, 2012.

The goal of this study was to analyze the anatomopathological and immunohistochemical profile for GFAP, Vimentin, COX-2 and β -amyloid in 14 cases of noninfectious encephalopathies in dogs, more specifically Granulomatous Meningoencephalitis (GME), Necrotizing Meningoencephalitis (NME) and Cerebral Amyloid Angiopathy (CAA). Clinical (gender, breed, age) and morphological (necrosis, presence of amyloid protein, inflammatory infiltrate) informations were collected regarding such animals. Microscopy slides with paraffin-embedded sections of tissue were elaborated for the immunohistochemical analysis, as well as positive controls for the reactions. The expressions of the proteins were graded as positive or negative for GFAP, Vimentin and COX-2, and the grading system described by Olichney was used for the β -amyloid. Animals of mixed breed (4/14, 28%), malteses (2/14, 14%), Labrador (2/14, 14%), Poodle (3/14, 21%), Fox Terrier (1/14, 7%), Pug (1/14, 7%) and Bichon Frisé (1/14, 7%) featured in this study, and most of them were males (9/14, 63%). All of the lesions observed were characteristic of such diseases, as perivascular cuffing with an abundant inflammatory infiltrate was observed in GME cases, being all 4 cases considered as disseminated GME. Necrosis, as well as the inflammatory infiltrate, was observed in all NME cases, which is the hallmark of this disease. The deposition of amyloid protein was observed in cases of CAA, which were confirmed by the Congo Red special staining. As for the immunohistochemical expression, all antibodies performed positive staining, and for the β -amyloid there was a predominance of grade 1 cases (5/6, 83%). In conclusion: 1. the clinical data reproduce the biological behavior of such diseases in dogs; 2. the immunohistochemical analysis of the lesions from GME, NME and CAA presented results coherent with those found in the literature; 3. positive staining for COX-2

presented an increased macrophage activity in the brain of those animals; 4. GFAP and Vimentin positive staining indicate a reaction by the glial cells against the presented lesion; 5. immunohistochemistry is a valid diagnostics tool for such diseases.

Keywords: Granulomatous Meningoencephalitis. Necrotizing Meningoencephalitis. Amyloid Angiopathy. Dogs. Immunohistochemistry. Neuropathology

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

APP	Proteína Precursora do Amilóide (do inglês <i>Amyloid Precursor Protein</i>)
CAA	Angiopatia Amilóide Cerebral (do inglês <i>Cerebral Amyloid Angiopathy</i>)
COX-2	Ciclooxigenase 2
DAB	Diaminobenzidina
ELISA	Ensaio de Imunoabsorção Ligada por Enzimas (do inglês <i>Enzyme-linked Immunoabsorbent Assay</i>)
GFAP	Proteína Glial Ácida Fibrilar (do inglês <i>Glial Fibrillary Acidic Protein</i>)
HIER	Recuperação de Epítomos Induzida por Calor (do inglês <i>Heat Induced Epitope Retrieval</i>)
IHQ	Imunohistoquímica
LCR	Líquido Cefalorraquidiano
MEG	Meningoencefalite Granulomatosa
MEN	Meningoencefalite Necrotizante
PBS	Solução Tampão Fosfato (do inglês <i>Phosphate Buffered Saline</i>)
SNC	Sistema Nervoso Central
SRD	Sem Raça Definida

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Encéfalo acometido por MEG	46
Figura 2 – Imagem macroscópica e microscópica de MEN	47
Figura 3 – Encéfalo acometido por CAA	48
Figura 4 – Marcação positiva de GFAP em encéfalo acometido por MEN.....	50
Figura 5 – Marcação positiva de GFAP em encéfalo acometido por MEG	51
Figura 6 – Marcação positiva de GFAP em encéfalo acometido por CAA	52
Figura 7 – Marcação positiva de Vimentina em encéfalo acometido por MEN	54
Figura 8 – Marcação positiva de Vimentina em encéfalo acometido por MEG	55
Figura 9 – Marcação positiva de Vimentina em encéfalo acometido por CAA	56
Figura 10 – Marcação positiva de COX-2 em encéfalo acometido por MEN	58
Figura 11 – Marcação positiva de COX-2 em encéfalo acometido por MEG	59
Figura 12 – Marcação positiva de A β em encéfalo acometido por CAA.....	61

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Questionário proposto por Rofina	33
Tabela 2 – Relação dos anticorpos utilizados	40
Tabela 3 – Apresentação dos casos analisados no estudo	44
Tabela 4 – Distribuição dos casos de MEN de acordo com o gênero, raça e idade	44
Tabela 5 – Distribuição dos casos de MEG de acordo com o gênero, raça e idade	45
Tabela 6 – Distribuição dos casos de CAA de acordo com o gênero, raça e idade	45

Sumário

1 INTRODUÇÃO.....	21
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	23
2.1 DIAGNÓSTICO DE ENCEFALOPATIAS	23
2.2 MENINGOENCEFALITE GRANULOMATOSA (MEG).....	25
2.2.1 Disseminada	25
2.2.2 Focal	26
2.2.3 Ocular	26
2.3 MENINGOENCEFALITE NECROTIZANTE (MEN).....	28
2.4 ANGIOPATIA AMILÓIDE CEREBRAL.....	30
2.5 MARCADORES IMUNOHISTOQUÍMICOS	34
2.5.1 PROTEÍNA GLIAL ÁCIDA FIBRILAR (GFAP)	35
2.5.2 VIMENTINA	36
2.5.3 AMILÓIDE β ($A\beta$).....	36
2.5.4 CICLOOXIGENASE-2 (COX-2)	37
3 OBJETIVOS.....	38
3.1 OBJETIVO GERAL	38
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	38
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	39
4.1 INFORMAÇÕES DOS ANIMAIS DO ESTUDO.....	39
4.2 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO E EXCLUSÃO	39
4.3 MÉTODO	39
4.3.1 Análise Morfológica.....	39
4.3.2 Estudo Imunohistoquímico.....	40
4.3.3 Protocolo de Reações.....	40
4.3.4 Análise das lâminas	41
5 RESULTADOS.....	43
5.1 DESCRIÇÃO DA POPULAÇÃO ESTUDADA	43
5.2 DESCRIÇÃO DA ANÁLISE MORFOLÓGICA.....	46
5.3 EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS POR IMUNOHISTOQUÍMICA	48
5.3.1 Anticorpo Anti-GFAP.....	48
5.3.2 Anticorpo Anti-Vimentina	53

5.3.3 Anticorpo Anti-COX-2	57
5.3.4 Anticorpo Anti-Amilóide β	60
6 DISCUSSÃO	62
6.1 TÉCNICA DE IMUNOHISTOQUÍMICA	65
7 CONCLUSÕES	68
8 CONSIDERAÇÕES FINAIS	69
REFERÊNCIAS	70

1 INTRODUÇÃO

Por definição, as encefalopatias são um grupo de doenças que acometem o encéfalo. Elas se apresentam de maneiras variadas, com sintomas diferindo pela área acometida do encéfalo.

Várias enfermidades do sistema nervoso central já foram descritas em animais, entre neoplasias, doenças infecciosas, parasitárias, má formações durante as fases embrionárias e, como serão descritas neste, as encefalites idiopáticas e encefalopatias ligadas à senilidade, mais especificamente a Meningoencefalite Granulomatosa (MEG), a Meningoencefalite Necrotizante (MEN) e a Angiopatia Amilóide Cerebral (CAA), doenças que serão analisadas neste estudo.

Estas doenças tem caráter idiopático, sem nenhum agente etiológico aparente, ou ainda descritos ou conhecidos. Não existe nenhum tipo de classificação para elas, e poucos estudos são feitos no Brasil e no mundo acerca de suas origens, formas de tratamento ou métodos de diagnóstico mais precoces e efetivos.

O diagnóstico destas doenças é quase sempre tardio, quando o animal já apresenta um quadro de lesões irreversíveis, com sintomas já bem instalados, e o tratamento acaba sendo insuficiente ou tendo que ser administrado por toda a vida do animal.

A apresentação clínica dos animais é variada. Em muitos casos, os primeiros sinais são inespecíficos ou não são observados como alterações pelos proprietários, o que leva a um atraso na busca pelo atendimento pelo clínico veterinário. Devido a esta demora na percepção dos sinais, existe uma piora do quadro clínico, que é progressivo. Os sintomas mais comuns são alterações comportamentais, head tilt, caminhar compulsivo, ataxia, crises convulsivas (muito frequentes em casos de MEN) e, para a CAA, sinais similares aos vistos em casos de Mal de Alzheimer em humanos, como disfagia, desorientação, alteração do ritmo circadiano e déficits de percepção. A Angiopatia Amilóide Cerebral nos cães é um excelente paralelo do Mal

de Alzheimer em humanos, dada sua semelhança de sinais e sintomas, homologia das proteínas envolvidas e progressão similares.

Como os primeiros sintomas destas doenças são inespecíficos, é importante diferenciar de outras afecções neurológicas, como tumores, infecções e traumas. Com isso, o tratamento pode ser melhor instaurado, e mais precocemente. Para as encefalites, o prognóstico é ruim caso haja uma detecção tardia da doença, pois o quadro é progressivo e muito rápido, e, no caso da MEN em particular, a degeneração progride com grande facilidade, em questão de dias. Com um tratamento bem estabelecido e administrado, podemos aumentar a sobrevida do animal e minimizar os efeitos destas doenças, controlando os quadros convulsivos e reduzindo a inflamação encefálica. No caso da CAA, uma detecção precoce é difícil, já que é difícil sugerir um diagnóstico antemortem devido à pluralidade de sintomas encontrados, mas pode ajudar a alterar o manejo do animal, para assim providenciar uma melhor qualidade de vida para este.

O uso da imunohistoquímica é importante no estudo destas doenças. Com um melhor entendimento da relação entre os sinais clínicos e sintomas apresentados, correlacionados com a apresentação das lesões histopatológicas e perfis imunohistoquímicos para anticorpos específicos, podemos providenciar mais pontos de vista sobre estas doenças, auxiliando o clínico veterinário no processo de diagnóstico destes animais.

Em conclusão, este estudo é importante para complementar os conhecimentos morfológicos e imunohistoquímicos das encefalopatias não infecciosas encontradas nos cães de diferentes raças.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 DIAGNÓSTICO DE ENCEFALOPATIAS

O diagnóstico das encefalopatias nos animais, em geral, é dado por uma conjunção de fatores: histórico, apresentação dos sintomas, análise de líquido cefalorraquidiano e, quando possível, exames de tomografia computadorizada ou ressonância magnética. A patologia clínica é essencial para diagnóstico em caso de afecções por protozoários, como por exemplo infecção por *Toxoplasma gondii*, podem ser detectadas por uma eosinofilia marcante (1500-2800 eosinófilos/ μ L). Encontramos leucocitose com desvio à esquerda em casos de meningite-arterite responsiva a esteróides (19000-27000 leucócitos/ μ L em 60% dos casos). Animais afetados pelo vírus da cinomose, em contrapartida, apresentam linfopenia (100-800 linfócitos/ μ L) (TIPOLD, 1995).

A maioria das análises de bioquímica sérica se mostram inespecíficos para este grupo de doenças, apesar de que em casos de doenças por protozoários é comum encontrarmos altos níveis de creatinina quinase, e quantidades elevadas de IgA no soro foram encontradas em 100% em meningite-arterite responsiva a esteróides (TIPOLD, 1995; THOMAS, 1998).

A análise citológica do líquido cefalorraquidiano (LCR) quanto a quantidade de células e teor de proteína se demonstra importante para direcionar o diagnóstico, mas não definir quais os diagnósticos diferenciais das encefalopatias, pois frequentemente (cerca de 90% dos casos) encontramos alterações de seus valores normais (THOMAS, 1998; SCHATZBERG, 2010). Em casos de MEG, encefalites bacterianas e infecções por protozoários são encontrados números elevados de células polimorfonucleares. Números muito elevados de células ($>1000/\mu$ L) são encontrados em casos de meningite-arterite responsiva a esteróides e alguns casos de MEG. Animais com infecções virais, como a cinomose e encefalites virais não classificadas, assim como a MEN apresentam pleiocitose por células mononucleares (principalmente linfócitos e macrófagos). Quanto a teor de proteínas, os mais altos

valores foram encontrados em animais com o complexo meningite-arterite responsiva a esteróides. Cerca de 30% dos animais tem concentrações proteicas no LCR em valores normais, especialmente nas formas não-inflamatórias da cinomose. Teores de IgG são altos em animais com doenças inflamatórias do Sistema Nervoso Central (SNC), e níveis de IgA e IgM intratecais estão aumentados em muitos dos casos (TIPOLD, 1995). Apesar de não serem isoladamente resultados definitivos para indicativos de diagnóstico, quando combinados a exames de imagem, ajudam a reduzir o leque de opções de diagnóstico.

Alguns exames complementares, como eletroencefalograma e eletromiografia se mostram úteis, contribuindo para o diagnóstico de processos irritativos e lesões de neurônio motor inferior. Diagnósticos por imagem são úteis para excluir doenças inflamatórias or para encontrar lesões extraneurais primárias. Mudanças secundárias do SNC, como hidrocefalia também são detectadas utilizando-se diagnósticos por imagem (TIPOLD, 1995). Outros métodos de diagnóstico por imagem, como a ressonância magnética (o exame de eleição para diagnóstico ante-mortem das Meningoencefalites) (SCHATZBERG, 2010), tomografia computadorizada ou mesmo o raio-x, podem ajudar a dar uma melhor visão sobre o animal, ajudando na identificação de tumores, lesões e podendo inferir um diagnóstico presuntivo de MEG, por exemplo.

Um erro comum é pensar que cães com afeções do SNC também apresentam alguma afecção sistêmica, mas na realidade, a maior parte dos cães não apresentam sinais extraneurais (THOMAS, 1998)

Em conclusão, diagnósticos diferenciais de encefalopatias só podem ser realizados utilizando-se de uma combinação de exames, sendo impossível fechar um diagnóstico com apenas uma análise isolada. A principal ferramenta a ser utilizada é o exame necroscópico e histopatológico, onde teremos o diagnóstico definitivo destas afecções, mas é extremamente importante estabelecer os diagnósticos diferenciais nos primeiros estágios da doença, para que o tratamento correto possa ser estabelecido.

2.2 MENINGOENCEFALITE GRANULOMATOSA (MEG)

A MEG é uma doença inflamatória do sistema nervoso central que geralmente ocorre em cães e, raramente, em gatos. Foi descrita pela primeira vez em 1978 (BRAUND, 1978), e acomete com maior frequência fêmeas jovens (idade média de 5 anos) de raças puras, toy e pequenas (maltês, pug, poodle, terrier), embora qualquer cão possa ser acometido, e estima-se que sejam de 5 a 25% das doenças do sistema nervoso central (BRAUND, 1985), e é provavelmente a segunda doença inflamatória do SNC mais comum em cães, sendo precedida apenas pela cinomose (ADAMO, 2004). É uma doença de curso rápido, de causa idiopática, mas como as lesões lembram as vistas em meningoencefalites alérgicas, pode haver um componente imunomediado envolvido, mediado por células T, caracterizando uma resposta anormal do organismo a um agente lesivo (GAROSI, 2006), dado a predominância de complexos de histocompatibilidade II e linfócitos T CD3+ (KIPAR, 1998). Afeta principalmente as áreas pontomedular e a substância branca (BRAUND, 1985; LOBETTI, 1996; MUNANA, 1998), e existem poucos relatos de áreas cerebelares afetadas (KITAGAWA, 2004).

Possui 3 apresentações, baseadas nas alterações clínicas e morfológicas (CUDDON, 1984):

2.2.1 Disseminada

Previamente conhecida por reticulose inflamatória, é a forma mais comum da doença, que assume um padrão difuso por todo o SNC. Há um acúmulo de células mononucleares e neutrófilos perivasculares no SNC. A progressão da doença é rápida, levando poucas semanas para se instalar (MUNANA, 1998). Os sintomas incluem ataxia, nistagmo, head tilt, convulsões e depressão. As lesões estão distribuídas por todo o SNC, primariamente na matéria branca de tronco cerebral,

cerebelo e/ou medula cervical, mas também pode afetar outras regiões do cérebro e medula vertebral (SCHATZBERG, 2010).

2.2.2 Focal

Se apresenta como uma lesão única, resultante da coalescência de lesões granulomatosas que tem aspecto e se comporta como uma neoplasia, usualmente encontradas no cérebro ou ângulo cerebelopontino, embora em poucos casos possa haver acometimento de cerebelo, detectado por ressonância magnética como uma massa inespecífica (KITAGAWA, 2004; SCHATZBERG, 2010), e até da medula do animal (SUMMERS, 1995). Os sintomas podem ser agudos ou de progressão mais lenta e dependem do local da lesão, podendo variar entre alterações comportamentais, síndromes vestibulares, head tilt, etc. É importante diferenciar a MEG Focal da Histiocitose Maligna e outros tumores por seus comportamentos serem similares, utilizando a combinação de métodos de diagnóstico por imagem, análise de LCR e manifestações clínicas (KITAGAWA, 2004; SCHATZBERG, 2010).

2.2.3 Ocular

A forma mais incomum da MEG, caracterizada por um déficit visual súbito causado pela formação dos manguitos perivasculares na região do nervo óptico, quiasma óptico, disco óptico e retina, bilateralmente. Cães com MEG ocular geralmente apresentam ou apresentam em pouco tempo sinais de MEG no encéfalo, e os vasos sanguíneos do segmento posterior do olho e úvea anterior apresentam o mesmo infiltrado inflamatório de vasos intracranianos. Sintomas comuns são pupilas dilatadas com ausência de reflexo à luz, edema do disco óptico e coriorretinite (SCHATZBERG, 2010).

O diagnóstico antemortem desta doença é complicado, pois não há um exame específico para a sua detecção, além de biópsia de tecido nervoso, seja do encéfalo ou medula. O método mais confiável para sugerir um diagnóstico é a colheita de LCR, que pode demonstrar um aumento no número de células brancas (linfócitos e macrófagos) e aumento no teor de proteínas (BAILEY, 1986). Exames de diagnóstico por imagem, como a ressonância magnética, podem ajudar a localizar a lesão, caso seja focal (VAN WINKLE, 1992; SCHATZBERG, 2010). Mesmo não sendo uma apresentação específica da MEG, na ressonância magnética temos uma hiperintensidade em T2 ou FLAIR, de aparência infiltrativa e margens irregulares (CHERUBINI, 2006). Testes sorológicos ou PCR podem ser feitos para buscar agentes infecciosos. Vale ressaltar que o diagnóstico definitivo só é realizado utilizando histopatologia.

Durante a necropsia, as lesões são evidentes caso a reação inflamatória seja suficiente. As lesões se concentram na matéria branca, particularmente na região cerebelomedular e são vistas como áreas de inchaço e coloração amarelo-acinzentada, infiltrando a estrutura normal (SUMMERS, 1995). As lesões histopatológicas se descrevem como angiocêntricas, não supurativas, apresentando um manguito perivascular constituído de histiócitos e/ou linfócitos, com a presença de monócitos e plasmócitos, predominantemente acometendo a substância branca do cérebro. Em casos de MEG disseminada, temos várias lesões junto aos vasos sanguíneos no cérebro, tronco cerebral caudal e meninges, predominantemente (SCHATZBERG, 2010). Em casos de MEG focal, a lesão é resultante da coalescência de infiltrados perivasculares em uma grande área, acometendo vários vasos sanguíneos (SUMMERS, 1995). A forma ocular também apresenta os mesmos manguitos perivasculares, mas localizados no nervo óptico e quiasma óptico, na região da retina ou pós-retina (NUHSBAUM, 2002).

O prognóstico para esta afecção é ruim, sendo que nas formas ocular e disseminada tem o pior prognóstico, com uma sobrevivência de alguns dias a até algumas semanas (PLATT, 2006), dependendo da localização da lesão e rapidez ao iniciar o tratamento. A maioria dos animais vêm a óbito apesar de estarem sob tratamento, que consiste basicamente de corticoesteróides (ex: prednisona, 1 a 2 mg/kg/12h VO) (BRAUND, 1985; GAROSI, 2006). Existem também alguns tratamentos imunomodulatórios, caso o animal não tolere corticoesteróides (GNIRS,

2006). Alguns animais sobrevivem por um curto período de tempo, girando em torno de cerca de 6 meses e, raramente, alguns anos. Não existe tratamento de eleição, sendo escolhido o tratamento ao qual o animal reaja melhor. O tratamento inicial geralmente é feito com doses imunossupressoras de prednisona, durante cerca de um mês. Esta dose pode ser reduzida com o passar dos meses, observando a reação do paciente. Alguns animais devem permanecer sob tratamento durante toda sua vida. Tratamentos com radiação, azatioprina, procarbazina, utilizados em combinação com a prednisona também se mostram efetivos no tratamento da Meningoencefalite granulomatosa (GAROSI, 2006). Um fator importantíssimo para a definição do prognóstico é a localização da lesão e sinais neurológicos focais versus multifocais. Cães com lesões focais tendem a ter uma sobrevida maior que cães com sinais multifocais (SCHATZBERG, 2010).

2.3 MENINGOENCEFALITE NECROTIZANTE (MEN)

A MEN é uma doença de caráter inflamatório, caracterizada por meningoencefalite multifocal, não supurativa e idiopática, de curso agudo (cerca de 2 semanas para o aparecimento dos sinais clínicos) ou crônico (cerca de 6 meses), de caráter progressivo (VIOLIN, 2008; HOSOMI, 2009), vista mais comumente em cães da raça Pug (por isso foi conhecida primeiramente por Encefalite do cão Pug), Maltês e algumas outras raças de pequeno porte, como Shih-tzu, Papillon, Yorkshire (JUNG, 2007, KITAGAWA, 2007). Sua etiologia é desconhecida, mas suspeitava-se de causas infecciosas. Tal hipótese foi descartada com o uso de PCR e provas sorológicas, e em estudos recentes foram encontrados anticorpos anti-astrocitários em LCR de alguns animais, sugerindo um componente auto-imune (SHIBUYA, 2006, LEVINE, 2008). Como muitos casos são encontrados na raça Pug, suspeita-se do envolvimento de um componente familiar (SCHATZBERG, 2010). Uma possibilidade de uma patogênese autoimune foi levantada quando foram encontrados anticorpos anti-GFAP no LCR de animais doentes (UCHIDA, 1999; MATSUKI, 2004; SHIBUYA, 2007), apesar de que podemos encontrar estes anticorpos em animais com tumores e até clinicamente saudáveis (SHIBUYA, 2007; TODA, 2007). A presença de

glomerulonefrites em relatos recentes reforça a possibilidade de ser um processo autoimune (Hosomi, 2009). Acomete animais com idades variando de 6 meses a 7 anos (SCHATZBERG, 2010), sendo a média de idade de 29 meses (CORDY, 1989). A apresentação e evolução dos sintomas neurológicos podem ser agudas ou crônicas, e predominam sinais de distúrbios prosencefálicos (convulsões, andar em círculos, deficit visual com reflexo pupilar preservado, head pressing, etc) e dores cervicais, possivelmente decorrentes de meningite. Em Yorkshires também é frequente observarmos sintomas de disfunção de tronco cerebral (p.e. doença vestibular central). Em alguns casos pode haver déficit de acuidade visual, embora na maioria dos casos os reflexos pupilares se mantêm preservados. O sinal mais consistente da MEN são as crises convulsivas, que ocorrem em intervalos variáveis, desenvolvendo-se progressivamente.

Em tentativa de diagnóstico ante-mortem, analisamos os sinais e sintomas, anamnese e achados de exame neurológico. Os valores obtidos em exame de sangue são geralmente normais, e os resultados da colheita de LCR mostram pleiocitose (>5 células/ μL) composta predominantemente ou até exclusivamente de células mononucleares e aumento do teor de proteína. Em Pugs e malteses observamos predominantemente linfócitos, enquanto no Yorkshire temos uma combinação de linfócitos e monócitos (TIPOLD, 1995). Pode-se fazer uso da tomografia computadorizada, onde temos lesões hipodensas frequentemente localizadas no prosencéfalo.

O diagnóstico definitivo é feito pela análise das lesões cerebrais à luz da histopatologia após terem sido observadas durante a necropsia. Em cortes transversais observa-se que essas lesões são geralmente assimétricas, e ocorrem predominantemente no córtex cerebral e substância branca subcortical (LEVINE, 2008). As áreas do centro semi oval e coroa radiada estão relativamente afundados e acinzentados, com perda de distinção entre substância branca e cinzenta. Encontramos também dilatação dos ventrículos e áreas de malácia (VIOLIN, 2008). Em histopatologia observamos acomentimento de substância branca e cinzenta. A inflamação e necrose tecidual são assimétricas e mais intensas na substância branca, visto em análise macroscópica, e a necrose é a característica marcante desta doença, com uma severidade variada, desde uma necrose neuronal microscópica e gliose em casos recentes, até grandes cavitações parenquimais em

casos crônicos (LEVINE, 2008). Perde-se a limitação entre a área de substância branca e substância cinzenta, facilmente visível durante a necrópsia (DE LAHUNTA, 2009). Na análise histopatológica, observamos o parênquima rarefeito e tomado por manguitos perivasculares e parenquimal de linfócitos (VIOLIN, 2008), células do plasma e histiócitos, além da necrose.

O tratamento destes pacientes é feito com glicocorticóides, como a prednisolona, em doses imunossupressoras, e anticonvulsivantes, caso haja convulsão, mas normalmente há pouca ou nenhuma melhora clínica apreciável, fazendo com que o prognóstico desta enfermidade seja grave. A maior parte dos animais ou vem a óbito ou é submetida à eutanásia, devido ao grave distúrbio neurológico progressivo que se desenvolve ao longo de cerca de 6 meses após o início da disfunção (HOSOMI, 2009).

2.4 ANGIOPATIA AMILÓIDE CEREBRAL

A Angiopatia Amilóide Cerebral (CAA) é uma doença esporádica e idiopática, relacionada principalmente à idade e causada por um depósito de uma proteína conhecida como Amilóide β ($A\beta$) nos vasos do córtex, leptomeninges e até no retículo endoplasmático neuronal (WALKER, 1997). Tal qual o Mal de Alzheimer em humanos, se expressa por uma disfunção cognitiva progressiva (MIRRA, 1991; CLARK, 2003). É mais frequente no lóbulo occipital, e menos frequente no hipocampo, cerebelo e gânglios basais (RENSIK, 2003). As regiões mais profundas de massa cinzenta, massa branca subcortical e tronco cerebral geralmente não apresentam acúmulos de amilóide. A definição de CAA e suas características foram descritas por Pantelakis, em 1954, e são: 1) envolvimento preferencial das pequenas artérias e capilares das meninges, córtex cerebral e cerebelar; 2) distribuição topográfica favorecendo as regiões posteriores do cérebro; 3) ausência de coloração dos vasos na substância branca; 4) associação com idade avançada e demência; 5) ausência de associação com hipertensão ou arteriosclerose; 6) ausência de amiloidose em outros órgãos (PANTELAKIS, 1954). Cerca de 90% dos cães acima

de 10 anos de idade apresentam sinais da doença, em maior ou menor grau, e esta condição aumenta significativamente o risco de acidentes vasculares cerebrais nestes animais, estando associada a 15 a 20% destes casos. Também existe a associação com formação de micro aneurismas, necrose fibrinóide e microangiopatias (RENSIK, 2003; BIFFI, 2011). A proteína associada a esta condição, o Amilóide β , também está relacionada à Doença de Alzheimer em humanos, e também à Hemorragia Cerebral com Amiloidose Hereditária, tipo Holandesa (Hereditary Cerebral Hemorrhage with Amyloidosis, Dutch Type - HCHWA-D). O A β se origina da clivagem de uma proteína maior, conhecida como Proteína Precursora do Amilóide (Amyloid Precursor Protein – APP), produzindo um peptídeo de 39 a 43 aminoácidos (NAKAMURA, 1997). Os segmentos mais longos, conhecidos como A β x-42 se depositam no cérebro, seguidos por fragmentos menores e mais solúveis, o A β x-40, que se acumula na parede dos vasos e placas senis. Os tipos de proteína amilóide podem ser diferenciados entre si por métodos de biologia molecular e imunohistoquímica (YU, 2011). Estudos recentes demonstram que há uma redução de mais de 50% do lúmen dos vasos, espessura de parede e diâmetro dos vasos como consequência destes acúmulos, elementos que causam uma maior predisposição dos animais de terem acidentes vasculares cerebrais. Também já foi demonstrado que algumas alterações genéticas também estão ligadas à deposição de A β , o que, em humanos ocorre mais frequentemente em pacientes portadores da Síndrome de Down, por exemplo, que expressam o gene codificador da APP com maior intensidade. Outras alterações podem auxiliar no desenvolvimento do Alzheimer em cães são o stress oxidativo, acúmulo de macrófagos, atrofia cortical e desmilenização (ROFINA, 2006).

Muitos aspectos da deposição de amilóide em cães faz com que estes sejam excelentes modelos para estudos de doenças relacionadas à idade em humanos. Primeiramente, é um evento espontâneo em cães, e mais de 90% dos cães em idade avançada (mais de 10 anos) apresentam amiloidose cerebral em algum nível. Além disso, o Amilóide β dos cães apresenta uma alta homologia com o A β humano, sendo aproximadamente 98% similares (COLLE, 2000), e os distúrbios cognitivos apresentados se assemelham com aqueles do Mal de Alzheimer (CUMMINGS, 1993; NAKAMURA, 1996). Alterações patológicas como o aparecimento de placas senis contendo A β e outros agregados proteicos característicos do Alzheimer em

humanos também foram observados em cães com diminuição da capacidade cognitiva (ROFINA, 2006).

Os sintomas da angiopatia amilóide são variados e muito semelhantes ao comportamento de pacientes portadores do mal de Alzheimer. A extensão das placas de A β presentes já foi comprovadamente correlacionada com a severidade da disfunção cognitiva do animal (ROFINA, 2006). Alterações comportamentais, caminhar compulsivo, desorientação durante as caminhadas e outros sintomas mais sutis podem passar despercebidos pelo proprietário. Por outro lado, há animais que deixam de reconhecer o dono, tem dificuldade para se alimentar, esquecem onde podem encontrar o alimento e o lado da porta pelo qual devem passar, cães que dormem durante o dia e ficam inquietos à noite, apresentam incontinência urinária e até convulsões (CUMMINGS, 1995; ROFINA, 2001). Foram propostos questionários para avaliar o grau de alteração neurológica em publicações internacionais. Um deles, feito por Rofina (2006), consolida as alterações comportamentais mais importantes a serem investigadas com os proprietários para avaliação do grau de demência do animal (Tabela 1), consolidando a idéia de outros questionários previamente propostos (KIATIPATTANASAKUL, 1996; COLLE, 2000; ROFINA, 2001). Este questionário foi assim idealizado pois, para evitar falsos positivos devido a uma grande quantidade de perguntas, é necessário que ele seja bem balanceado. Quando lidamos com doenças relacionadas à idade, também é de extrema importância definir se a idade é apenas um fator incidental ou se é um fator determinante para o desenvolvimento do quadro, pois é quando lidamos com muitos sintomas diferentes é provável que se trate de uma condição causada por múltiplos fatores (ROFINA, 2006).

Tabela 1 - Questionário proposto por Rofina (2006).

Itens	Pontuação
1: Apetite	
Normal	1
Diminuído	2
Aumentado com diarreia	3
Aumentado sem diarreia	4
2: Sede	
Normal	1
Polidipsia	3
3: Incontinência ativa	
Não incontinente	1
Urina em casa	2
Urina e defeca pela casa	4
4: Ritmo dia/noite	
Normal	1
Dorme mais	2
Dorme de dia, agitado à noite	3
5: Comportamento sem sentido	
Sem comportamento aberrante	1
Olha para as estrelas	2
Caminhar estereotipado	3
Caminhar em círculos	4
6: Atividade/interação	
Normal	1
Diminuído	2
Sem contato com o ambiente/dono	4
7: Perda de percepção	
Sem perda	1
Colide com móveis	2
Tenta passar por espaços estreitos	5
Tenta passar pelo lado errado da porta	5
8: Desorientação	
Sem desorientação	1
Em lugares novos	2
Em caminhadas diárias	4
Em casa	5
9: Memória	
Normal	1
Não reconhece conhecidos	2
Não reconhece o dono após feriados/viagens	4
Não reconhece o dono diariamente	5
10: Mudanças de personalidade	
Sem mudanças	1
Agressivo a outros animais e/ou crianças	3
Agressivo ao dono	4
Pontuação total:	
Pontuação de demência (pontuação total - pontuação total normal):	

O diagnóstico definitivo da angiopatia amilóide se dá no exame histopatológico. Observa-se ao redor dos vasos o acúmulo de proteína amilóide, que pode ser comprovado fazendo uso de colorações específicas, como o Vermelho Congo, onde é observado a birrefringência verde nas áreas com amilóide (JIN, 2003, ROFINA, 2006). O exame imunohistoquímico também pode ser utilizado para o diagnóstico e também para definir qual o tipo de proteína amilóide está presente no encéfalo (YU, 2011).

2.5 MARCADORES IMUNOHISTOQUÍMICOS

A base da imunohistoquímica é simples: com ela, demonstramos antígenos em cortes histológicos pelo uso de anticorpos específicos. Uma vez que o conjugado antígeno-anticorpo é formado, esta união é demonstrada pelo uso de colorações histoquímicas, visíveis por microscopia de luz ou luz ultravioleta. Mesmo sendo uma técnica com uma base simples, muitos avanços foram feitos no quesito de apresentação de antígenos, colorações e também para possibilitar múltiplos exames em uma única lâmina, como é o caso do Microarranjo de Tecidos (RAMOS-VARA, 2005). A imunohistoquímica consegue providenciar um imunoensaio com a reprodutibilidade e características quantitativas de um teste ELISA, que, além de detectarem um elemento específico (proteína ou antígeno), também dá uma medida precisa e confiável de suas quantidades relativa e real (DABBS, 2010).

Os anticorpos utilizados nos exames imunohistoquímicos podem ser de duas origens: monoclonais ou policlonais. Os anticorpos monoclonais, geralmente advindos de camundongos que são expostos ao antígeno escolhido. O uso destes anticorpos oferece uma maior especificidade no exame imunohistoquímico, o que diminui a ocorrência de reações cruzadas com outros antígenos, gerando um menor número de falsos positivos (RAMOS-VARA, 2005). Em contrapartida, anticorpos policlonais tem maior sensibilidade, por conter diferentes espécies moleculares do anticorpo, com diferentes especificidades (DABBS, 2010). Entretanto, isso confere também uma menor especificidade geral do anticorpo, pois quanto mais diferentes

anticorpos são utilizados, maior a possibilidade de reações cruzadas com diferentes antígenos do que aquele que se busca estudar, gerando mais resultados falso-positivo. A Fibronectina III, por exemplo, tem 65 proteínas completamente não-relacionadas dividindo domínios imunogênicos em comum (RAMOS-VARA, 2005).

2.5.1 PROTEÍNA GLIAL ÁCIDA FIBRILAR (GFAP)

A Proteína Glial Ácida Fibrilar (GFAP, do inglês Glial Fibrillary Acidic Protein) é uma proteína de filamento intermediário tipo III, uma superfamília de fibras de aproximadamente 10 nm (FUCHS, 1994). Sua produção é regulada por vários processos, como alterações na concentração de citocinas e níveis hormonais. Um aumento evidente na expressão de GFAP é vista sob várias circunstâncias, e é comumente referido como “ativação astrocitária”. Durante o desenvolvimento, a vimentina (outro filamento intermediário tipo III) aparece junto ao GFAP em células da glia imaturas, assim como em gliomas, mas não em astrócitos maduros (REEVES, 1989). Isso demonstra uma possível ação de interação entre as duas proteínas, mais do que atuações isoladas.

No encéfalo, o GFAP se expressa nos astrócitos, e está envolvido em diferentes atividades, como proteína estrutural e de movimento, comunicação celular e funcionamento da barreira hematoencefálica. Também é uma proteína importante na interação neurônio-astrócito, função estudada utilizando RNA antisense, onde astrócitos sem a expressão de GFAP não formam extensões com os neurônios. Células de Purkinje de ratos knock out para GFAP não apresentam estrutura normal (SHIBUKI, 1996), sugerindo que sua expressão é uma importante ferramenta de comunicação celular nestas células, e possivelmente em outras.

2.5.2 VIMENTINA

A Vimentina é a principal proteína de filamento intermediário encontrada em células mesenquimais (ERIKSSON, 2009), e apresenta grande homologia entre as espécies (HERRMANN, 1989; SCHAFFELD, 2001). Até recentemente se conhecia pouco sobre esta proteína, pois camundongos sem expressão dela se apresentaram com poucos sintomas (COLLUCI-GUYON, 1994). Mais recentemente foi demonstrado que estes animais possuem grandes defeitos em funções celulares que envolvem a vimentina, como por exemplo a regulação da morfologia de células da glia (COLLUCI-GUYON, 1999), e fibroblastos knockout para vimentina demonstraram deficiência na mobilidade e migração, causando um déficit no reparo de lesões (ECKES, 2000). É um marcador importante na detecção de neoplasias, sendo um marcador excelente para sarcomas, identificando o mesênquima (LEADER, 1987).

2.5.3 AMILÓIDE β ($A\beta$)

O Amilóide β ($A\beta$) é uma proteína de 36 a 43 aminoácidos, processada a partir da Proteína Precursora do Amilóide (APP), por dois processos enzimáticos (LAHIRI, 2010). Apesar de estar ligada à doenças como o Mal de Alzheimer e a CAA, o $A\beta$, em suas funções normais, presume-se que tenha um papel de sinalizador molecular para TrkA (um receptor de tirosina quinase), MAPK (proteína quinase ativada por mitógenos) e JNK (quinase Jun N-terminal), proteínas ligadas ao ciclo celular, entre muitas outras (LAHIRI, 2010). Como citado anteriormente, a marcação imunohistoquímica para detectar e diferenciar os tipos de $A\beta$ é importante para estudos sobre o efeito desta proteína sobre a apresentação clínica destas doenças.

2.5.4 CICLOOXIGENASE-2 (COX-2)

Também conhecida por Prostaglandina-Endoperóxido Sintase 2, é uma proteína descrita pela primeira vez em 1991 (XIE, 1991), responsável por converter o Ácido Araquidônico em Prostaglandinas (O'BANION, 1999). Em situações normais ela não se expressa na maior parte das células, mas altos níveis são encontrados durante situações de inflamação (KURUMBAIL, 2001), assim como as prostaglandinas, proteínas responsáveis pela mediação de inflamações. Em neurociências, é muito estudada como fator de influência sobre tumores do sistema nervoso central (Joachims, 2008; Temel, 2009; Myung, 2010; El-sayed, 2011).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Análise anatomopatológica e imunohistoquímica de encéfalos de cães acometidos por Meningoencefalite Granulomatosa, Meningoencefalite Necrotizante e Angiopatia Amilóide.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Descrever os aspectos anatomopatológicos das lesões encefálicas pelas 3 doenças em questão em cães
2. Estudar a expressão dos marcadores GFAP, β -amilóide, Vimentina e COX-2 por técnica de imunohistoquímica em cortes histológicos de encéfalo
3. Correlacionar os dados anatomopatológicos e imunohistoquímicos

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 INFORMAÇÕES DOS ANIMAIS DO ESTUDO

Os encéfalos dos animais utilizados neste estudo são aqueles disponíveis no Laboratório de Neuropatologia Experimental e Comparada da FMVZ-USP. São encéfalos de cães de raças e idades variadas.

4.2 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO E EXCLUSÃO

Animais com histórico e sintomatologia compatíveis com as afecções em questão, cujos encéfalos tenham sido previamente avaliados por um Médico Veterinário, com blocos de parafina disponíveis, contendo material suficiente para o estudo. Materiais com fixação inadequada ou sem material suficiente para os estudos histopatológicos e imunohistoquímicos foram excluídos do estudo.

4.3 MÉTODO

4.3.1 Análise Morfológica

Os blocos, previamente incluídos em parafina, foram seccionados individualmente em cortes de 5 µm de espessura para a confecção de lâminas histológicas e subsequente avaliação histopatológica. A avaliação foi feita à luz de

um microscópio óptico. Para os casos de MEG, foi feita a classificação de acordo com a literatura, entre Focal, Disseminada e Ocular. Para os casos de MEN, foi avaliada a presença de necrose, fator determinante do diagnóstico. Para os casos de CAA, foi observada a presença do Amilóide, que foi evidenciado com o uso da coloração Vermelho Congo.

4.3.2 Estudo Imunohistoquímico

A Tabela 2 indica os marcadores utilizados no estudo e suas respectivas diluições:

Tabela 2 – Anticorpos utilizados

Anticorpo	Tipo	Clone	Origem	Diluição	Fabricante	Código
Anti-GFAP	Monoclonal	6F2	Camundongo	1:500	DAKO	M0761
Anti-Vimentina	Monoclonal	Vim 3B4	Camundongo	1:200	DAKO	M7020
Anti-COX 2	Monoclonal	CX-294	Camundongo	1:500	DAKO	M3617
Anti-β Amilóide	Monoclonal	6F/3D	Camundongo	1:500	DAKO	M0872

4.3.3 Protocolo de Reações

As lâminas Starfrost® foram submetidas à desparafinização em duas soluções de xilol 100%, por 10 e 5 minutos. A preparação das lâminas foi feita através de passagens sucessivas em etanol por 1 minuto (100%, 95% e 70%) e

então lavagem em água corrente por 5 minutos. A recuperação antigênica foi feita por calor (HIER), com a utilização de forno microondas e solução tampão citrato 10 mM pH 6,0 por 9 minutos, seguida de resfriamento em água corrente por 5 minutos. O bloqueio da peroxidase endógena foi feita com solução de peróxido de hidrogênio a 3% (água oxigenada 10 vol.), uma vez por 20 minutos, seguida de lavagem em água corrente por 5 minutos. Incubaram-se as lâminas com o anticorpo primário diluído em título pré-estabelecido, em tampão PBS, por 24 horas, à temperatura ambiente, em câmara úmida. As lâminas, então, foram lavadas em tampão PBS com troca tripla de 5 minutos cada. A incubação das lâminas com o anticorpo secundário anti-camundongo e anti-coelho (ADVANCETM Dako - LINK), pronto para uso, teve duração de 30 minutos à temperatura ambiente e posterior lavagem em tampão PBS com três trocas de 5 minutos cada. O polímero de amplificação horseradish peroxidase, pronto para uso, foi incubado por 30 minutos à temperatura ambiente com posterior lavagem tripla de 5 minutos cada, em tampão PBS. Foram utilizados 20 µL do cromógeno 3,3' diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB) (Dako – Liquid DAB + 50 Substrate, K3468), em 1mL de tampão substrato pronto para uso, para a revelação da reação por cerca de 10 segundos à temperatura ambiente. Após a observação do desenvolvimento do precipitado, as lâminas foram lavadas em água corrente por 5 minutos, foram contra-coradas com Hematoxilina de Harris (Sigma) por 15 segundos e lavadas em água corrente por 5 minutos. Foi feita a diafanização em etanol (70%, 95% e 100%), e xilol (três banhos) e subsequente montagem das mesmas para a leitura. As reações foram acompanhadas de controle positivo, em tecido sabidamente positivo para o anticorpo testado, e controle negativo, realizado pela omissão do anticorpo primário e substituição por PBS.

4.3.4 Análise das lâminas

As lâminas de foram observadas e avaliadas da presente maneira: para o anticorpo anti A β , foi utilizada a classificação proposta por Olichney et al. (1995), onde temos quatro graus de severidade da lesão, sendo eles: 1, positividade para A β dispersa nos vasos da leptomeninge ou intracorticais; 2, positividade forte para o

A β , circundando vasos da leptomeninge ou intracorticais; 3, positividade forte e abundante para o A β , circundando vasos da leptomeninge ou intracorticais; 4, igual ao 3, mas com alterações disfóricas adicionais. Para os outros anticorpos (GFAP, Vimentina e COX-2) foi definido apenas a presença ou ausência de marcação, subdividindo as regiões marcadas em Encéfalo, Cerebelo e Ponte.

5 RESULTADOS

5.1 DESCRIÇÃO DA POPULAÇÃO ESTUDADA

Foram analisados 14 encéfalos de cães com diagnóstico histopatológico de MEG (2 machos e 2 fêmeas), MEN (3 machos e 1 fêmea) e CAA (4 machos e 2 fêmeas). A faixa etária dos animais variou de 2 a 6 anos para MEG (com média de idade de 3,7 anos), 1 a 4 anos para MEN (média de idade de 2,5 anos) e de 11 a 15 anos para a CAA (média de idade de 12,8 anos). Todos os blocos de parafina analisados apresentaram material suficiente para a análise.

Abaixo temos as tabelas (Tabelas 3, 4, 5 e 6) relacionando os dados dos animais utilizados no estudo:

Tabela 3 – Apresentação dos casos analisados no estudo

Doença	Raça	Idade (anos)
MEG	SRD	6
	SRD	3
	Bichon Frisé	4
	Labrador	2
MEN	Maltês	4
	Labrador	3
	Pug	1
	Maltês	2
CAA	Poodle	13
	Fox Terrier	13
	SRD	15
	SRD	12
	Poodle	13
	Poodle	11

Tabela 4 - Distribuição dos casos de MEN de acordo com o gênero, raça e idade

	Categoria	n	(%)
Sexo	Macho	3	(75,0)
	Fêmea	1	(25,0)
Raça	Maltês	2	(50,0)
	Labrador	1	(25,0)
	Pug	1	(25,0)
Idade	< 2 anos	2	(50,0)
	≥ 2 anos	2	(50,0)

Tabela 5 - Distribuição dos casos de MEG de acordo com o gênero, raça, idade e classificação

	Categoria	n	(%)
Sexo	Macho	2	(50,0)
	Fêmea	2	(50,0)
Raça	SRD	2	(50,0)
	Labrador	1	(25,0)
	Bichon Frisé	1	(25,0)
Idade	< 4 anos	2	(50,0)
	≥ 4 anos	2	(50,0)
Classificação	Focal	0	(0,0)
	Disseminada	4	(100,0)
	Ocular	0	(0,0)

Tabela 6 - Distribuição dos casos de CAA de acordo com o gênero, raça e idade

	Categoria	n	(%)
Sexo	Macho	4	(66,6)
	Fêmea	2	(33,3)
Raça	SRD	2	(33,3)
	Poodle	3	(50,0)
	Fox Terrier	1	(16,6)
Idade	< 12 anos	4	(66,6)
	≥ 12 anos	2	(33,3)

5.2 DESCRIÇÃO DA ANÁLISE MORFOLÓGICA

Na análise morfológica, para os casos de MEG, predominaram os casos de MEG disseminada, sem nenhum caso de MEG ocular ou focal. Os casos de MEG avaliados apresentaram, além dos manguitos, infiltrado inflamatório linfoplasmocítico disperso pelo parênquima encefálico, sem a formação de concentrações celulares. Isso caracteriza os casos como de Meningoencefalite Granulomatosa disseminada.

Figura 1 – Encéfalo acometido por MEG. Observe o manguito perivascular característico da doença, no centro da foto

Em todos os casos de MEN foram encontradas áreas de necrose, características desta afecção, além do infiltrado inflamatório linfoplasmocítico, encontrado principalmente na região de necrose e em manguitos perivasculares e

macrófagos. Também foram encontrados macrófagos espumosos, característicos de áreas de necrose, pois são células da micróglia que fagocitam debris celulares

Figura 2 - Imagem macroscópica e seu correspondente microscópico de um encéfalo acometido por MEN.

Os casos de CAA foram identificados pelo agregado proteico circundando os vasos do encéfalo, posteriormente confirmados como sendo proteína amilóide por meio da coloração Vermelho Congo, onde observamos a proteína como uma birrefringência esverdeada sob luz polarizada. Como não houve disponibilidade de um microscópio com câmera fotográfica que realizasse a polarização de imagens não foi possível demonstrar a birrefringência.

Figura 3 – Encéfalo acometido por CAA.

5.3 EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS POR IMUNOHISTOQUÍMICA

A expressão das proteínas foi dividida em anticorpos como a seguir:

5.3.1 *Anticorpo Anti-GFAP*

A análise da expressão de GFAP foi realizada em todos os casos.

Para os casos de MEG, foram observados 100% dos casos com marcação positiva em encéfalo, mas sem marcação em cerebelo e ponte. Para os casos de MEN, 100% dos casos apresentaram marcação positiva em encéfalo, 25% apresentaram marcação em cerebelo e 25% apresentaram marcação positiva em ponte. Para os casos de CAA, foram encontrados 100% dos casos com marcação

positiva em encéfalo, 33,3% dos casos com marcação positiva em cerebelo e 16,6% com marcação positiva em ponte. A marcação positiva do GFAP é encontrada em astrócitos, principalmente.

Figura 4 – Marcação positiva para GFAP em encéfalo acometido por MEN, aumento de 10x (A) e 40x (B)

Figura 5 – Marcação positiva para GFAP em encéfalo acometido por MEG, em aumento de 10x (A) e 40x (B)

Figura 6 – Marcação positiva de GFAP em encéfalo acometido por CAA, em aumento de 10x (A) e 40x (B)

5.3.2 Anticorpo Anti-Vimentina

A análise da expressão de Vimentina foi realizada em todos os casos de MEG, MEN e CAA.

Houve marcação em todos os cortes. A principal marcação foi a de tecido vascular, mas o mais importante é a marcação dos prolongamentos dos astrócitos. Para as três doenças, houve marcação positiva em todos os casos, embora seja observado a marcação do prolongamento de astrócitos nos casos de MEG e MEN apenas, como indicativo da reatividade dos astrócitos.

Figura 7 – Expressão positiva de Vimentina em encéfalo acometido por MEN, em aumento de 10x (A) e 40x (B)

Figura 8 – Expressão positiva de Vimentina em encéfalo acometido por MEG, em aumento de 10x (A) e 40x (B)

Figura 9 – Expressão positiva de Vimentina em encéfalo acometido por CAA, em aumento de 10x (A) e 40x (B)

5.3.3 Anticorpo Anti-COX-2

A análise da expressão de COX-2 foi realizada nos casos de MEG e MEN.

Para os casos de MEG foram observados 100% dos casos com marcação positiva em encéfalo, mas sem marcação em cerebelo e ponte. Para os casos de MEN, foram observados 100% dos casos com marcação positiva em encéfalo, nenhum em cerebelo e 25% em ponte. A marcação observada se dá nos neurônios, com uma fraca marcação do citoplasma.

Figura 10 – Expressão positiva de COX-2 em encéfalo acometido por MEN, em aumento de 10x (A) e 40x (B)

Figura 11 – Expressão positiva de COX-2 em encéfalo acometido por MEN, em aumento de 10x (A) e 40x (B)

5.3.4 Anticorpo Anti-Amilóide β

A análise da expressão de A β foi realizada em todos os casos de CAA.

Como descrito anteriormente, foram divididos em 4 classificações. Foi observado que 66,6% dos casos apresentaram marcação grau 1 e 16,6% com marcação grau 2 em encéfalo, 16,6% apresentaram marcação grau 1 em cerebelo e 33,3% apresentaram marcação grau 1 em ponte. O A β é detectado principalmente acumulado junto aos vasos sanguíneos e em placas neurais pelo parênquima encefálico.

Figura 12 – Expressão positiva de A β em encéfalo de cão acometido por CAA, agregado a vaso sanguíneo em aumento de 10x (A) e 40x (B)

6 DISCUSSÃO

O presente estudo teve como principal objetivo a avaliação de lesões observadas em casos de MEG, MEN e CAA em encéfalos de cães encontrados nos arquivos do Laboratório de Neuropatologia da FMVZ-USP, e caracterizá-las de acordo com seus aspectos anatomopatológicos e expressão imunohistoquímica para as proteínas GFAP, COX-2, Vimentina e A β .

Os blocos de parafina utilizados foram recuperados de arquivo, dos quais não havia identificação relacionando a região do encéfalo representada, prejudicando a proposta de uma melhor caracterização das doenças. Esta falta de informações não descaracteriza a avaliação histopatológica retrospectiva dos casos, embora uma melhor descrição da localização das lesões seria de grande valia para definir padrões de desenvolvimento das lesões.

A MEG é classificada como uma encefalite idiopática. Segundo Schatzberg (2010), acomete principalmente animais jovens idade e de raças pequenas. Há relatos de que fêmeas são proporcionalmente mais acometidas do que machos, mas apesar disso, neste estudo a relação machos:fêmeas é de 1:1. Em relação a idade, os animais pesquisados apresentam uma idade média de 3,7 anos, condizente com o observado por Muñana (1996) que disse que os sintomas se tornam perceptíveis em animais com quatro anos de idade, em média. Como descrito por Braund (1985), malteses, pugs, poodles e terriers são os mais acometidos, o que não foi observado neste estudo, já que apenas um dos animais é de raça pequena. Os desvios de padrão destes parâmetros está ligado ao baixo número de casos avaliados.

Na avaliação histopatológica das lâminas utilizadas, foi possível identificar a presença de monócitos e histiócitos, como sugerido por Summers (1995) sobre as lesões resultarem da migração e maturação de histiócitos ou monócitos provenientes do sangue. Há infiltrado inflamatório mononuclear abundante disperso pelo parênquima encefálico e na forma de manguitos perivasculares, e sob as leptomeninges. O infiltrado é geralmente visto em cérebro, região caudal de ponte, medula cervical e meninges (SCHATZBERG, 2010). As lesões observadas nestes

casos são características da variante disseminada. Na literatura não há estudos que definam os principais locais de lesão no encéfalo dos animais acometidos. Apesar disso, a forma disseminada da doença é predominante em relação as suas outras apresentações (SCHATZBERG, 2010), o que condiz com os achados deste estudo. Em lesões granulomatosas crônicas de MEG focal pode haver a compressão do encéfalo, levando a necrose e edema vasogênico (BRAUND, 1985; SUMMERS, 1995). Um estudo conduzido por Muñana (1998) avaliou o prognóstico desta doença utilizando 42 animais. Os cães acometidos pela MEG focal foram os que tiveram a maior sobrevida, embora todos tenham levado pouco tempo para ir a óbito. Isso caracterizou a doença como com um prognóstico ruim.

A etiopatogenia da MEG ainda continua um mistério. Existem trabalhos que apontam para uma causa autoimune, como o estudo conduzido por Kipar (1998), que propôs que a MEG seja o resultado de uma hipersensibilidade tardia com base autoimune, fato reforçado pelo estudo de Suzuki (2003), onde se firmou que de fato há a presença de linfócitos T CD3+ e não há nenhum CD79+. Além disso, anticorpos anti-GFAP foram encontrados no LCR de cães que vieram a óbito por um quadro de MEG (MATSUKI, 2004). Isso demonstra a importância de uma caracterização completa do perfil inflamatório que se apresenta na MEG para definir se a inflamação é de fato o fator primário observado, ou se é consequência de algum outro fator externo.

A MEN é classificada como encefalite idiopática. Ela acomete principalmente cães jovens, com média de idade de dois anos, sendo as fêmeas mais afetadas que machos (CORDY, 1989; LEVINE, 2008). No presente estudo estas proporções foram mantidas, sendo que 75% dos animais eram fêmeas e 25% machos, com proximadamente 2 anos de idade. Podemos verificar que é uma doença de maior frequência em cães de raças pequenas, como Maltês (STALIS, 1995; VIOLIN, 2008) Shih-tzu, Pappillon e Yorkshire (JUNG, 2007; KITAGAWA, 2007), mas é especialmente frequente em Pugs, o que sugere um componente familiar na patogenia desta doença (SCHATZBERG, 2010). Esta predileção por raças de pequeno porte foi observada nos animais estudados, sendo que, de quatro animais, apenas um se encontra classificado como sendo de raça de grande porte, um Labrador.

Na análise histopatológica das lâminas foi possível observar áreas de necrose não supurativa, com um intenso infiltrado inflamatório linfoplasmocítico, como descrito por Schatzberg (2010), bem como manguitos perivasculares e infiltrado inflamatório submeningeal. Nas áreas de necrose percebe-se uma perda na diferenciação entre substância branca e cinzenta, como descrito por de Lahunta (2009). Estas lesões são características da MEN. Não foram descritos padrões de lesão, predileção de região encefálica ou aspectos histopatológicos que criem uma caracterização mais precisa.

A MEN tem sua etiopatogenia tão desconhecida quanto a MEG. Um estudo demonstrou que a Encefalopatia Necrosante Aguda (ANE) em crianças é fruto de vários fatores diferentes, sendo que o gatilho seria a infecção pelo vírus da influenza e parainfluenza, aliados a uma mutação no gene RANBP2 (NEILSON, 2009). Como a MEN tem um comportamento similar ao da ANE, é possível compararmos as duas doenças e sugerir que a MEN siga o mesmo processo, uma combinação de predisposição genética e um fator infeccioso externo, levando a uma reação autoimune que causa a necrose. A hipótese de causa autoimune é reforçada pelo fato de que anticorpos anti-GFAP também foram encontrados no LCR de animais acometidos por MEN, assim como os de MEG (UCHIDA, 1999; MATSUKI, 2004; SHIBUYA, 2007). Entretanto, apenas um caso de MEN teve relato de isolamento viral, um vírus herpes-like (CORDY, 1989), e até o presente momento não foi possível isolar nenhum vírus em casos de MEN (SCHATZBERG, 2010). Embora não se tenha conseguido isolar nenhum vírus, esta possibilidade não foi descartada, já que as lesões associadas à MEN são similares às observadas

Segundo Rofina (2006), a CAA acomete fêmeas e machos na mesma proporção, com idades acima de 10 anos, sem predileção racial. Dos casos apresentados a idade é compatível com a literatura encontrada, apresentando animais com uma média de 12,8 anos. Em relação ao sexo, foi observado uma proporção de fêmeas: machos de 1:2 e, quanto as raças, a predileção está para raças pequenas, apesar de ser comentado que não há predileção racial.

A apresentação dos casos na avaliação histopatológica foi típica, como proposto por Vinters (1987), com agregados perivasculares de proteína amilóide, posteriormente evidenciados pela coloração Vermelho Congo, onde pode ser

observada a birrefringência esverdeada sob a luz polarizada, o que evidencia a presença da proteína amilóide no encéfalo dos animais avaliados. Também foram observadas áreas de hemorragia submeningeal.

É importante frisar que a CAA canina já foi descrito como semelhante ao mal de Alzheimer em muitas características, como na apresentação clínica, onde observamos o mesmo comportamento de desorientação ao caminhar, incontinência ativa e alteração do ciclo circadiano (CUMMINGS, 1995; ROFINA, 2001), bem como as alterações microscópicas de espessamento de vasos, presença de depósitos de proteína amilóide no parênquima encefálico e dano oxidativo. Entretanto, diferente dos humanos, não são observadas placas senis, agregados neurofibrilares, corpúsculos de Hirano e corpúsculos de degeneração granulovacuolar (YU, 2011) em cães, provavelmente devido ao fato de que os animais vem à óbito mais rapidamente, não tendo tempo de apresentar estas outras características (PAPAIOANNOU, 2001).

6.1 TÉCNICA DE IMUNOHISTOQUÍMICA

Uma vez que o tecido encefálico é extremamente frágil, a confecção das laminas demandou um grande trabalho de técnica, como durante o processo de confecção das lâminas para a imunohistoquímica, ou durante a recuperação antigênica por calor (HIER), no qual há um risco de perda de tecido caso o calor seja muito intenso.

Para este estudo foi utilizado o kit HRP-ADVANCE® (Dako), que utiliza o DAB como cromógeno. Este kit produz uma coloração marrom escura nas células marcadas, que, em comparação ao kit ENVISION® (Dako), que utiliza o Permanent Red como cromógeno, que cria uma coloração avermelhada, é mais sensível, já que a coloração do Permanent Red pode confundir a visualização da marcação.

Para a realização do estudo foi necessário um processo de definição de concentrações adequadas de anticorpos a serem utilizadas nos protocolos utilizados,

pois diferentes técnicas de coloração que demandam uma adaptação a diferentes marcadores, principalmente pelo fato de que os anticorpos utilizados são para a marcação de proteínas humanas. Durante o processo foram necessários vários ensaios utilizando concentrações diferentes dos anticorpos com a finalidade de atingir os melhores resultados com diferentes kits. Estes ensaios foram realizados tendo como ponto de partida a concentração recomendada pelo fabricante e então a correção das diluições, dependendo da necessidade.

Os casos de MEG e MEN apresentaram marcação positiva para os três anticorpos utilizados, GFAP, Vimentina e COX-2. Os dados para GFAP e Vimentina foram dentro do esperado. A marcação positiva destes dois anticorpos demonstram que existe uma reação astrocitária e gliose em resposta ao processo inflamatório existente, mas é necessário definir padrões de marcação para a imunohistoquímica, para melhor caracterizar o padrão de marcação e melhor classificar estas lesões.

A marcação do anticorpo anti COX-2, demonstra que existe um possível aumento na atividade macrófágica, e confirma que antiinflamatórios inibidores da ação da COX-2 podem ser de grande auxílio no controle destas doenças. Como apresentado por Aid (2010), a superexpressão de COX-2 não leva a um aumento na reação inflamatória, mesmo sob a influência de um agente infeccioso, o que descarta a influência de um fator de aumento da atividade de COX-2 neuronal como um fator de grande influência na reação inflamatória exacerbada. Entretanto, como este mesmo autor descreve em outro trabalho, a deleção do gene que codifica a COX-2 leva a um aumento na reação inflamatória (AID, 2008). Portanto, mesmo que haja uma superexpressão desta proteína no encéfalo, não é uma justificativa para o desenvolvimento do quadro inflamatório exagerado. Em humanos, o COX-2 tem sido estudado principalmente como marcador no desenvolvimento de astrocitomas (TEMEL, 2009; EL-SAYED, 2011), oligodendromas (TEMEL, 2009), carcinomas de células de Merckell (JOACHIMS, 2008), e, para gliomas, o nível de expressão em imunohistoquímica pode ser utilizado para definir grau do tumor e o prognóstico destes pacientes (MYUNG, 2010). Este trabalho apresenta um dos primeiros relatos de marcação deste anticorpo para estas doenças em cães.

Como foi observado, é possível realizar a marcação destes anticorpos para estas doenças, assim sendo, os estudos devem ser direcionados para uma melhor

caracterização do tipo de infiltrado inflamatório presente na MEG e na MEN por meio da imunohistoquímica, o que pode levantar hipóteses mais concretas sobre sua etiologia e auxiliar na definição de tratamentos mais eficazes e diagnósticos mais precoces.

As marcações de CAA foram positivas para os três anticorpos, GFAP, Vimentina e A β . A marcação por GFAP e Vimentina também representa uma reação astrocitária à lesão, o que fortalece a teoria de que existe algum tipo de agressão pelo A β x 39-43, como a oclusão dos vasos, e o encéfalo reage a isso. Os depósitos de A β já foram estudados em muitas espécies, e sua localização se dá principalmente na substância cinzenta e na parede de vasos leptomeningeais e parenquimais (YU, 2011). Neste estudo não foi possível determinar as regiões do encéfalo afetadas pela presença do A β , mas foi relatado que o neocortex e suas leptomeninges são os mais acometidos, seguidos pelo hipocampo, cerebelo e gânglios basais (WALKER, 1997).

A marcação do A β reforça a idéia de que o A β canino e humano tem grande homologia (COLLE, 2000), já que o anticorpo utilizado é desenhado para a marcação de A β em humanos, e de que o cão é um bom modelo de comparação com o humano para a CAA. Em humanos é feita a diferenciação do tipo de A β presente no encéfalo por meio da imunohistoquímica em encéfalos de pacientes com mal de Alzheimer, o que pode ajudar futuros estudos desta doença

7 CONCLUSÕES

Em função dos resultados obtidos pelas análises histopatológicas e imunohistoquímicas dos casos apresentados, temos:

- A classificação das lesões histopatológicas dos casos estudados vai ao encontro com a literatura encontrada, apresentando lesões compatíveis com as descritas em outros estudos.
- A análise imunohistoquímica das lesões de MEG, MEN e CAA apresentou resultados dentro dos quadros descrito na literatura.
- Os casos de MEG, MEN e CAA apresentados neste estudo apresentam o mesmo padrão de raça e idade descritos na literatura.
- A CAA apresenta semelhanças com o mal de Alzheimer em humanos, como apresentação das lesões, homologia das proteínas envolvidas, apresentação clínica e semelhanças na avaliação imunohistoquímica, como visto em literatura, comprovando que cão é um bom modelo de comparação com o humano quando analisando o quadro de CAA.
- As marcações de GFAP e Vimentina comprovam uma reação das células da glia às lesões apresentadas nas três doenças.

8 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este estudo foi de grande importância para complementar os conhecimentos morfológicos e de expressão de proteínas das encefalopatias não infecciosas encontradas nos cães. A imunohistoquímica é uma técnica avançada, que auxilia em procedimentos de diagnóstico.

Muitos estudos ainda devem ser feitos acerca destas doenças, já que ainda há muito a ser desvendado sobre elas, como se desenvolve a etiopatogenia, mecanismos de ação e correlação com a clínica destes animais. É importante ressaltar que um bom acompanhamento clínico, análise das lesões por técnicas de diagnóstico por imagem, aliadas a um exame de necrópsia completo são importantes para futuros estudos envolvendo estas doenças.

REFERÊNCIAS

ADAMO, F. P.; O'BRIEN, R. T. Use of cyclosporine to treat granulomatous meningoencephalitis in three dogs. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 225, n. 8, p. 1211-1216, 2004.

AID, S.; LANGEBACH, R.; BOSETTI, F. Neuroinflammatory response to lipopolysaccharide is exacerbated in mice genetically deficient in cyclooxygenase-2. **Journal of Neuroinflammation**, v. 5, p. 17, 2008.

AID, S.; PARIKH, N.; PALUMBO, S.; BOSETTI, F. Neuronal overexpression of cyclooxygenase-2 does not alter the neuroinflammatory response during brain innate immune activation. **Neuroscience Letters**, v. 478, p. 113-118, 2010.

BAILEY, C. S.; HIGGINS, R. J. Characteristics of cerebrospinal fluid associated with canine granulomatous meningoencephalomyelitis: a retrospective study. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 188, n. 4, p. 418-421, 1986.

BIFFI, A.; GREENBERG, S. M. Cerebral Amyloid Angiopathy: A Systematic Review. **Journal of Clinical Neurology**, v. 7, n. 1, p. 1-9, 2011.

BORRÀS, D.; FERRER, I.; PUMAROLA, M. Age-related Changes in the Brain of the Dog. **Veterinary Pathology**, v. 36, p. 202, 1999.

BRAUND, K. G. Granulomatous meningoencephalomyelitis. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 186, p. 138-141, 1985.

BRAUND, K. G.; VANDEVELDE, M.; WALKER, T. L. Granulomatous meningoencephalomyelitis in six dogs. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v. 172, n. 10, p. 1195-1200, 1978.

CHERUBINI, G.; PLATT, S.; ANDERSON, T.; RUSBRIDGE, C.; LORENZO, V.; MANTIS, P.; CAPPELLO, R. Characteristics of magnetic resonance images of granulomatous meningoencephalomyelitis in 11 dogs. **Veterinary Record**, v. 159, p. 110–115, 2006.

CLARK, C. M.; KARLAWISH, J. H. Alzheimer's disease: current concepts and emerging diagnostic and therapeutic strategies. **Annals of Internal Medicine**, v. 138, n. 5, p. 400-410, 2003.

COLLE, M. A.; HAUW, J. J.; CRESPEAU, F.; UCHIHARA, T.; AKIYAMA, H.; CHECLER, F.; PAGEAT, P.; DUYKAERTS, C. Vascular and parenchymal A β deposition in the aging dog: correlation with behavior. **Neurobiology of Aging**, v. 21, n. 5, p. 695-704, 2000.

COLUCCI-GUYON, E.; GIMENEZ, Y. R. M.; MAURICE, T.; BABINET, C.; PRIVAT, A. Cerebellar defect and impaired motor coordination in mice lacking vimentin. **Glia**, v. 25, n. 1, p. 33–43, 1999.

COLUCCI-GUYON, E.; PORTIER, M. M.; DUNIA, I.; PAULIN, D.; POURNIN, S.; BABINET, C. Mice lacking vimentin develop and reproduce without an obvious phenotype. **Cell**, v. 79, n.4, p. 679–694, 1994.

CORDY, D. R.; HOLLIDAY, T. A. A necrotizing meningoencephalitis of pug dogs. **Veterinary Pathology**, v. 26, n. 3, p. 191–194, 1989.

CUDDON, P.; SMITH-MAXIE, L. Reticulosis of the central nervous system in the dog. **Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian**, v. 6, p. 23–32, 1984.

CUMMINGS, B. J.; HEAD, E.; RUEHL, W.; MILGRAM, N. W.; COTMAN, C. W.; The canine as an animal model of human aging and dementia. **Neurobiology of Aging**, v. 17, n. 2, p. 259-268, 1996.

CUMMINGS, B. J.; PIKE, C. J.; SHANKEL, R.; COTMAN, C. W.; β -Amyloid deposition and other measures of neuropathology predict cognitive status in Alzheimer's disease. **Neurobiology of Aging**, v. 17, n. 6, p. 921-933, 1996.

DABBS, D. **Diagnostic Immunohistochemistry**: theranostic and genetic applications. 3rd ed. Philadelphia: Elsevier, 2010.

DE LAHUNTA, A.; GLASS, E. **Veterinary Neuroanatomy and Clinical Neurology**. 3rd ed. Philadelphia: W.B. Saunders, 2009.

ECKES, B.; COLLUCI-GUYON, E.; SMOLA, H.; NODDER, S.; BABINET, C.; KRIEG, T.; MARTIN, P. Impaired wound healing in embryonic and adult mice lacking vimentin. **Journal of Cell Science**, v. 113, p. 2455–2462, 2000.

EL-SAYED, M.; TAHA, M. M. Immunohistochemical expression of cyclooxygenase-2 in astrocytoma: Correlation with angiogenesis, tumor progression and survival. **Turkish Neurosurgery**, v. 21, p. 27-35, 2011.

ERIKSSON, J. E.; DECHAT, T.; GRIN, B.; HELFAND, B.; MENDEZ, M.; PALLARI, H. M.; GOLDMAN, R. D. Introducing intermediate filaments: from discovery to disease. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 119, n. 7, p. 1763–1771, 2009.

HEAD, E.; Brain aging in dogs: parallels with human brain aging and Alzheimer's disease. **Veterinary Therapeutics**, v. 2, n. 3, p. 247-260, 2001.

GAROSI, L. S.; CNS Inflammatory (UK) Problems: The Neurologist's Viewpoint, Clinical Approach and Treatment. In: INTERNATIONAL CONGRESS OF THE ITALIAN ASSOCIATION OF COMPANION ANIMAL VETERINARIANS, n.50, 2006, Rimini, Itália. **Proceedings of the 53o Congresso Nazionale Multisala SCIVAC**, 2006, p. 31-32.

GNIRS, K. Ciclosporin treatment of suspected granulomatous meningoencephalomyelitis in three dogs. **Journal of Small Animal Practice**, v. 47, n. 4, p. 201–206, 2006.

HERRMANN, H.; FOUQUET, B.; FRANKE, W.W. Expression of intermediate filament proteins during development of *Xenopus laevis*. I. cDNA clones encoding different forms of vimentin. **Development**, v. 105, n. 2, p. 279–298, 1989.

HOSOMI, F. Y. M.; RAMOS, A. T.; MASUDA, E. K.; TROST, M. E.; GRAÇA, D. L.; MAIORKA, P. C.; Aspectos Clínico-Patológicos em Casos de Meningoencefalite Necrosante Canina. **Clínica Veterinária**, v. 13, n. 18, p. 62-68, 2009.

JIN, L. W.; CLABORN, K. A.; KURIMOTO, M.; GEDAY, M. A.; MAEZAWA, I.; SOHRABY, F.; ESTRADA, M.; KAMINSKY, W.; KHAR, B. Imaging linear birefringence and dichroism in cerebral amyloid pathologies. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A.**, v. 100, n. 26, p. 15294-15298, 2003.

JUNG, D. I.; KANG, B. T.; PARK, C.; YOO, J. H.; GU, S. H.; JEON, H. W.; KIM, J. W.; HEO, R. Y.; SUNG, H. J.; EOM, K. D.; LEE, J. H.; WOO, E. J.; PARK, H. M. A Comparison of Combination Therapy (Cyclosporine plus Prednisolone) with Sole Prednisolone Therapy in 7 Dogs with Necrotizing Meningoencephalitis; **Journal of Veterinary Medical Science**, v. 69, n. 12, p. 1303-1306, 2007.

KIATIPATTANASAKUL, W., NAKAMURA, S., HOSSAIN, M.M., NAKAYAMA, H., UCHINO, T., SHUMIYA, S., GOTO, N., DOI, K. Apoptosis in the aged dog brain. **Acta Neuropathologica**, v. 92, p. 242–248, 1996.

KIPAR, A.; BAUMGÄRTNER, W.; VOGL, C.; GAEDKE, K.; WELLMAN, M.; Immunohistochemical Characterization of Inflammatory Cells in Brains of Dogs with Granulomatous Meningoencephalitis; **Veterinary Pathology**, v. 35, n. 1, p. 43-52, 1998.

KITAGAWA, M.; KANAYAMA, K.; SATOH, T.; SAKAI, T. Cerebellar Focal Granulomatous Meningoencephalitis in a Dog: Clinical Findings and MR Imaging. **Journal of Veterinary Medicine**, v. 51, n. 6, p. 277–279, 2004.

KITAGAWA, M.; OKADA, M.; KANAYAMA, K.; SATO, T.; SAKAI, T. A Canine Case of Necrotizing Meningoencephalitis for Long-term Observation: Clinical and MRI Findings. **Journal of Veterinary Medical Science**, v. 69, n. 11, p. 1195-1198, 2007.

KURUMBAIL, R.; KIEFER, J. R.; MARNETT, L. J. Cyclooxygenase enzymes: Catalysis and inhibition. **Current Opinion in Structural Biology**, v. 11, n. 6, p. 752–760, 2001.

LAHIRI, D. K.; MALONEY, B. Beyond the signaling effect role of amyloid- β 42 on the processing of APP, and its clinical implications. **Experimental Neurology**, v. 225, n. 1, p. 51–54, 2010.

LEADER, M.; COLLINS, M.; PATEL, J.; HENRY, K. Vimentin: an evaluation of its role as a tumour marker. **Histopathology**, v. 11, n. 1, p. 63–72, 1987.

LEVINE, J. M.; FOSGATE, G. T.; PORTER, B.; SCHATZBERG, S. J.; GREER, K. Epidemiology of necrotizing meningoencephalitis in Pug dogs. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 22, n. 4, p. 961–968, 2008.

LOBETTI, G. R.; PERSON, J. Magnetic resonance imaging in the diagnosis of focal granulomatous meningoencephalomyelitis in two dogs. **Veterinary Radiology and Ultrasound**, v. 37, n. 6, p. 424–427, 1996.

LORENZ, M. D.; KORNEGAY, J. N. **Neurologia veterinária**. 4. ed. São Paulo: Manole, 2006. p. 404.

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

MIRRA, S. S.; HEYMAN, A.; MCKEEL, D.; SUMI, S. M.; CRAIN, B. J.; BROWNLEE, L. M.; VOGEL, F. S.; HUGHES, J. P.; VAN BELLE, G.; BERG, L. The Consortium to Establish a Registry for Alzheimer's Disease (CERAD), Part II: Standardization of the neuropathologic assessment of Alzheimer's disease. **Neurology**, v. 41, n. 4, p. 479–486, 1991.

MUÑANA, K. R. Encephalitis and meningitis. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v. 26, p. 857–875, 1996.

MUÑANA, K. R.; LUTTGEN, P. J. Prognostic factors for dogs with granulomatous meningoencephalomyelitis: 42 cases (1982-1996). **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 212, n. 12, p. 1902–1906, 1998.

MYUNG, J.; CHO, B. K.; KIM, Y. S.; PARK, S. H. Snail and Cox-2 expressions are associated with WHO tumor grade and survival rate of patients with gliomas. **Neuropathology**, v. 30, p. 224-231, 2010.

NAKAMURA, S.; NAKAYAMA, H.; KIATIPATTANASAKUL, W.; UETSUKA, K.; UCHIDA, K.; GOTO, N. Senile plaques in very aged cats. **Acta Neuropathologica**, v. 91, n. 4, p. 437-439, 1996.

NAKAMURA, S.; TAMAOKA, A.; SAWAMURA, N.; KIATIPATTANASAKUL, W.; NAKAYAMA, H.; SHOJI, S.; YOSHIKAWA, Y.; DOI, K. Deposition of amyloid β protein (A β) subtypes [A β 40 and A β 42(43)] in canine senile plaques and cerebral amyloid angiopathy. **Acta Neuropathologica**, v. 94, n. 4, p. 323-328, 1997.

NEILSON, D. E.; ADAMS, M. D.; ORR, C. M.; SCHELLING, D. K.; EIBEN, R. M.; KERR, D. S.; ANDERSON, J.; BASSUK, A. G.; BYE, A. M.; CHILDS, A. M.; CLARKE, A.; CROW, Y. J.; DI ROCCO, M.; DOHNA-SCHWAKE, C.; DUECKERS, G.; FASANO, A. E.; GIKA, A. D.; GIONNIS, D.; GORMAN, M. P.; GRATTANSMITH, P. J.; HACKENBERG, A.; KUSTER, A.; LENTSCHIG, M. G.; LOPEZ-LASO, E.; MARCO, E. J.; MASTROYIANNI, S.; PERRIER, J.; SCHMITT-MECHHELKE, T.; SERVIDEI, S.; SKARDOUTSOU, A.; ULDALL, P.; VAN DER KNAAP, M. S.; GOGLIN, K. C.; TEFFT, D. L.; AUBIN, C.; DE JAGER, P.; HAFLER, D.; WARMAN, M. L. Infection-triggered familial or recurrent cases of acute necrotizing encephalopathy caused by mutations in a component of the nuclear pore, RANBP2. **American Journal of Human Genetics**, v. 84, p. 44–51, 2009.

NUHSBAUM, M. T.; POWELL, C. C.; GIONFRIDDO, J. R.; CUDDON, P. A. Treatment of granulomatous meningoencephalomyelitis in a dog. **Veterinary Ophthalmology**, v. 5, n. 1, p. 29–33, 2002.

O'BANION, M. K. Cyclooxygenase-2: Molecular biology, pharmacology, and neurobiology. **Critical reviews in neurobiology**, v. 13, n. 1, p. 45–82, 1999.

OLICHNEY, J. M.; HANSEN, L. A.; HOFSTETTER, C. R.; GRUNDMAN, M.; KATZMAN, R.; THAL, L. J. Cerebral infarction in Alzheimer's disease is associated with severe amyloid angiopathy and hypertension. **Archives of Neurology**, v. 52, n. 7, p. 702-708, 1995.

PANTELAKIS, S. A particular type of senile angiopathy of the central nervous system: congophilic angiopathy, topography and frequency. **Monatsschrift für Psychiatrie und Neurologie**, v. 128, n. 4, p. 219-256, 1954.

PAPAIIOANNOU, N.; TOOTEN, P. C.; VAN EDEREN, A.M.; BOHL, J. R.; ROFINA, J. Immunohistochemical investigation of the brain of aged dogs. I. Detection of neurofibrillary tangles and of 4-hydroxynonenal protein, an oxidative damage product, in senile plaques. **Amyloid**, v. 8, p. 11-21, 2001.

PLATT, S. R. Inflammatory Central Nervous System Disease of the Dog. In: WSAVA CONGRESS, Praga, 2006. Proceedings of the 31st WSAVA, 2006, 532-539.

RAMOS-VARA, J. A. Technical Aspects of Immunohistochemistry. **Veterinary Pathology**, v. 42, n. 4, p. 405–426, 2005.

REEVES, S. A.; HELMAN, L. J.; ALLISON, A.; ISRAEL, M. A. Molecular cloning and primary structure of human glial fibrillary acidic protein. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A.**, v. 86, n. 13, p. 5178–5182, 1989.

RENSINK, A. A. M.; DE WAAL, R. M. W.; KREMER, B.; VERBEEK, M. M. Pathogenesis of cerebral amyloid angiopathy. **Brain Research Reviews**, v. 43, n. 2, p. 207-223, 2003.

ROFINA, J.E., van DER MEER, I., GOOSSENS, M., SECRÈVE, M., EDEREN VAN, A.M., SCHILDER, M., GRUYS, E. Preliminary inquiry to assess behavior changes in

aging pet dogs. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON AMYLOIDOSIS, 9., 2001, Budapest, 2001. p. 464–466.

ROFINA, J. E.; VAN EDEREN, A. M.; TOUSSAINT, M. J. M.; SECRÈVE, M.; VAN DER SPEK, A.; VAN DER MEER, I.; VAN EERDENBURG, F. J. C. M.; GRUYS, E. Cognitive disturbances in old dogs suffering from the canine counterpart of Alzheimer's disease. **Brain Research**, v. 1069, n.1, p. 216-226, 2006.

RUTGERS, K. S.; VAN REMOORTERE, A.; VAN BUCHEM, M. A.; VERRIPS, C. T.; GREENBERG, S. M.; BACSKAI, B. J.; FROSCH, M. P.; VAN DUINEN, S. G.; MAAT-SCHIEMAN, M. L.; VAN DER MAAREL, S. M. Differential recognition of vascular and parenchymal beta amyloid deposition. **Neurobiology of Aging**, v. 32, n. 10, p. 1774-1783, 2009.

SCHAFFELD, M.; HERRMANN, H.; SCHULTESS, J.; MARKL, J. Vimentin and desmin of a cartilaginous fish, the shark *Scyliorhinus stellaris*: sequence, expression patterns and in vitro assembly. **European Journal of Cell Biology**, v. 80, n. 11, p. 692-702, 2001.

SHIBUKI, K.; GOMI, H.; CHEN, L.; BAO, S.; KIM, J. J.; WAKATSUKI, H.; FUJISAKI, T.; FUJIMOTO, K.; KATOH, A.; IKEDA, T.; CHEN, C.; THOMPSON, R. F.; ITOHARA, S. Deficient cerebellar long-term depression, impaired eyeblink conditioning, and normal motor coordination in GFAP mutant mice. **Neuron**, v. 16, n. 3, p. 587-599, 1996.

SHIBUYA, M.; MATSUKI, N.; FUJIWARA, K.; IMAJOH-OHMI, S.; FUKUDA, H.; PHAM, N. T.; TAMAHARA, S.; ONO, K. Autoantibodies against glial fibrillary acidic protein (GFAP) in cerebrospinal fluids from Pug dogs with necrotizing meningoencephalitis. **Journal of Veterinary Medical Science**, v. 69, n.3, p. 241–245, 2007.

STALIS, I. H., CHADWICK, B., DAYRELL-HART, B., SUMMERS, B. A. & VAN WINKLE, T. J. Necrotizing meningoencephalitis of Maltese dogs. **Veterinary Pathology**, v. 32, p. 230–235, 1995.

SUMMERS, B. A.; CUMMINGS, J. F.; DE LAHUNTA, A. **Veterinary Neuropathology**, p. 110-114, Ed. Mosby, 1995.

SUZUKI, M.; UCHIDA, K.; MOROZUMI, M.; HASEGAWA, T.; YANAI, T.; NAKAYAMA, H.; TATEYAMA, S.; A Comparative Pathological Study on Canine Necrotizing Meningoencephalitis and Granulomatous Meningoencephalomyelitis; **Journal of Veterinary Medical Science**, v. 65, n. 11, p. 1233-1239, 2003.

SUZUKI, M.; UCHIDA, K.; MOROZUMI, M.; YANAI, T.; NAKAYAMA, H.; YAMAGUCHI, R.; TATEYAMA, S.; A Comparative Pathological Study on Granulomatous Meningoencephalomyelitis and Central Malignant Histiocytosis in Dogs; **Journal of Veterinary Medical Science**; v. 65, n. 12, p.1319-1324, 2003.

TERLIZZI, R.; PLATT, S. R.; The Function, Composition and Analysis of Cerebrospinal Fluid in Companion Animals: Part II – Analysis; **The Veterinary Journal**, v. 180, n. 1, p 15-32, 2007.

THAL, D. R.; CAPETILLO-ZARATE, E.; LARIONOV, S.; STAUFENBIEL, M.; ZURBRUEGG, S.; BECKMANN, N.; Capillary cerebral amyloid angiopathy is associated with vessel occlusion and cerebral blood flow disturbances. **Neurobiology of Aging**, v. 30, n. 12, p. 1936-1948, 2009.

THOMAS, W. B. Inflammatory diseases of the central nervous system in dogs. **Clinical Techniques in Small Animal Practice**, v. 13, n. 3, p. 167–178, 1998.

TIPOLD, A. Diagnosis of inflammatory and infectious diseases of the central nervous system in dogs: a retrospective study. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 9, n. 5, p. 304-314, 1995.

TODA, Y.; MATSUKI, N.; SHIBUYA, M.; FUJIOKA, I.; TAMAHARA, S.; ONO, K. Glial fibrillary acidic protein (GFAP) and anti-GFAP autoantibody in canine necrotising meningoencephalitis. **Veterinary Record**, v. 161, n. 8, p. 261–264, 2007.

UCHIDA, K.; HASEGAWA, T.; IKEDA, M.; YAMAGUCHI, R.; TATEYAMA, S.
Detection of an autoantibody from Pug dogs with necrotizing encephalitis (Pug dog encephalitis). **Veterinary Pathology**, v. 36, n. 4, p. 301–307, 1999.

UCHIDA, K.; TANI, Y.; UETSUKA, K.; NAKAYAMA, H.; GOTO, N.;
Immunohistochemical studies on canine cerebral amyloid angiopathy and senile plaques. **The Journal of Veterinary Medical Science**, v. 54, n.4, p. 659-667, 1992.

VAN WINKLE, T. J.; STEINBERG, S. A.; WORTMAN, J. A. Computed tomography in the diagnosis of focal granulomatous meningoencephalitis: retrospective evaluation of three cases. **Journal of the American Animal Hospital Association**, v. 28, p. 327-332, 1992.

VINTERS, H.V. Cerebral amyloid angiopathy. **Stroke**, v. 18, p. 311-329, 1987.

VIOLIN, K. B.; QUEIROZ, N. G. T.; HOSOMI, F. Y. M.; RAMOS, A. T.; AMARAL, H. A.; KOGIKA, M. M.; MACHADO, G. F.; MAIORKA, P. C.; Meningoencefalite Necrotizante do Cão Maltês. **Ciência Rural**; v. 38, n. 3, p. 836-838, 2008.

VITE, C. H.; BRAUND, K. G. Inflammatory Diseases of the Nervous System; Braund's Clinical Neurology in Small Animals: Localization, Diagnosis and Treatment. In: www.ivis.org, 2005.

WALKER, L. C.; Animal models of cerebral β -amyloid angiopathy. **Brain Research Reviews**, v. 25, n. 1, p. 70-84, 1997.

WEIGEL, J.; WISNIEWSKI, H. M.; DZIEWIATKOWSKI, J.; TARNAWSKI, M.; NOWAKOWSKI, J.; DIZEWIATKOWSKA, A.; SOLTYSIAK, Z.; The origin of amyloid in cerebral vessels of aged dogs. **Brain Research**, v. 705, v. 1-2, 225-234, 1995.

XIE, W. L.; CHIPMAN, J. G.; ROBERTSON, D. L.; ERIKSON, R. L.; SIMMONS, D. L. Expression of a Mitogen-Responsive Gene Encoding Prostaglandin Synthase is Regulated by mRNA Splicing. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 88, n. 7, p. 2692–2696, 1991.

YU, C. H.; SONG, G. S.; YHEE, J. Y.; KIM, J. H.; IM, K. S.; NHO, W. G.; Lee, J. H.; SUR, J. H. Histopathological and Immunohistochemical Comparison of the Brain of Human Patients with Alzheimer's Disease and the Brain of Aged Dogs with Cognitive Dysfunction. **Journal of Comparative Pathology**, v. 145, n. 1, p. 45-58, 2011.